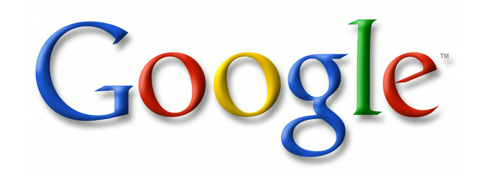


This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

+ *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.
+ *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.
+ *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.
+ *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at http://books.google.com/

GREEN-WINDISCH

DIE ENZYME

Digitized by Google


106 393 705

G7°oe

Harvard University



FARLOW
REFERENCE LIBRARY
OF
CRYPTOGAMIC BOTANY



Digitized by Google



Digitized by Google

Digitized by Google

J. Reynolds Green.

Die Enzyme.

Ins Deutsche übertragen

von

Prof. Dr. Wilhelm Windisch.



BERLIN.
VERLAGSBUCHHANDLUNG PAUL PAREY.
Verlag für Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwesen.
SW., Hedemannstrasse 10.
1901.

Digitized by Google

Oct. 9, 1923
Harvard University
Farlow Library

Digitized by Google

Vorwort des Verfassers.

Die verschiedenen Probleme, die mit Gärungserscheinungen im Zusammenhang stehen, sind in den letzten 10 Jahren der Gegenstand des Interesses so vieler Forscher in verschiedenen Ländern gewesen und beschäftigen heute noch den Geist so vieler Forscher, dafs es zweckmäfsig erschien, die bislang erzielten Ergebnisse, so weit als dies möglich, zusammenzutragen und über den Gesamtgegenstand, so wie er sich heute darbietet, eine Ansicht zu formulieren.

Die Entdeckung der Zymase durch *Buchner*, des Enzyms, das die alkoholische Gärung bewirkt, hat erneutes Interesse für die ganze Frage wachgerufen und hat zunächst gezeigt, was man schon so lange vermutete, dafs die Bildung von Alkohol in eine Linie zu stellen ist mit anderen Zersetzungsprozessen, die man bis vor einigen Jahren unter dem Namen „Fermentationsprozesse" zusammenfafste.

Es erschien dem Verfasser aus manchen Gründen wünschenswert, auf die Beziehungen zwischen „Fermentation" im weiteren Sinne und den allgemeinen Stoffwechselerscheinungen der lebenden Organismen ein besonderes Gewicht zu legen. Neuere Entdeckungen lassen immer klarer erkennen, welche hervorragende Rolle die Enzyme im intracellularen Stoffwechsel spielen; es wurde immer deutlicher, dafs der bislang gemachte Unterschied zwischen organisierten und unorganisierten Fermenten auf eine unvollkommene Kenntnis der Stoffwechselprozesse in höheren sowohl, als auch niederen Pflanzen beruhte und nun im Lichte besserer Kenntnisse durchaus aufgegeben werden mufs. Die Entdeckung der Zymase, auf die schon hingewiesen wurde, bringt

Digitized by Google

auch die letzten noch verbliebenen Unterschiede zum Verschwinden.

Sobald wir aufhören, die „Fermentation“ ausschliefslich mit den niederen Formen lebender Organismen in Verbindung zu bringen, erkennt man, dafs die vitalistische Theorie der Schule *de Latours* und *Pasteurs*, die die alkoholische Gärung insbesondere als Leben unter verschiedenen Ernährungs- oder Lüftungsbedingungen anspricht, nicht mehr im stande ist, alle Thatsachen zu umfassen. Die neueren Forschungen gehen über die Phase hinaus, in der *Pasteur* uns die Materie hinterliefs, indem sie uns zeigen, dafs sich im Leben der höheren Organismen ganz ähnliche Vorgänge abspielen. Es ist daher nötig, in die Beziehungen zwischen Protoplasma und Stoffwechsel tiefer einzudringen, den Zusammenhang zwischen Fermenten oder Enzymen und der lebenden Substanz klarer zu erforschen und auf diese Weise den innigen Zusammenhang der Fermentation mit dem gewöhnlichen Stoffwechsel nachzuweisen. Man kann noch weiter gehen und in Betracht ziehen, durch welche chemische oder physikalische Prozesse die beobachteten Veränderungen oder Zersetzungen durch das Protoplasma oder seine Sekretionen bewirkt werden.

Die neueren Ansichten *Emil Fischers* über die Konfiguration der Enzyme und der verschiedenen von ihnen angegriffenen Körper, Ansichten, die sich auf sorgfältige und mühevolle Forschungen stützen, weisen uns auf eine neue chemische Hypothese über ihre Wirksamkeit, die den Ansichten der vitalistischen Schule der älteren Forscher nicht zuwiderläuft, sondern sie erweitert, wenn nicht ganz und gar zum Abschlufs bringt. Dafs die Arbeit der Enzyme in letzter Instanz in der Natur eine chemische und nicht eine physikalische ist, wird durch die schönen Untersuchungen von *Croft Hill* wahrscheinlich gemacht, auf die am Ende dieses Buches Bezug genommen wird.

J. Reynolds Green,
Prof. der Botanik bei der engl. pharmazeutischen Gesellschaft am Trinity College in Cambridge.

Digitized by Google

Vorwort des Übersetzers.

Als das vorliegende Buch — als das Erste auf diesem Gebiet überhaupt — an die Öffentlichkeit kam, erregte es mit Recht die Aufmerksamkeit der beteiligten Fachkreise. Es giebt kaum einen Zweig der Naturwissenschaft, der, im letzten Jahrzehnt besonders, so intensiv den Forschergeist in Anspruch nahm, wie das Gebiet, auf dem sich die in mehr als einer Beziehung hochinteressanten Wirkungen der Enzyme abspielen. Die ungeheure Bedeutung dieser Gruppe von Körpern hat man heutzutage vollauf erkannt; sie beschäftigt den Botaniker, den Physiologen, den Mediziner, den Chemiker in gleicher Weise und in gleich hohem Grade. Wo vor 20 Jahren kaum rudimentäre Ansätze vorhanden waren, da nimmt heute in der Wissenschaft und im Lehrplan der Hochschulen die Lehre von den Enzymen und ihren Wirkungen bereits eine sehr wichtige Stelle ein. Und wie tief greifen nicht die Enzyme in die Praxis der Gärungsgewerbe hinein! Da ist kaum vom Anfang bis zum Ende ein Vorgang, eine Operation, die sich nicht auf die Wirkung eines Enzyms oder mehrerer zurückführen liefse! Ein Studierender der Botanik, der Physiologie, Pflanzen- sowohl, als auch Tierphysiologie, der Medizin und der Chemie, die Industriellen der Gärungsgewerbe, die den Wunsch und die Absicht haben, in die wissenschaftlichen Vorgänge, die sich in grofser Zahl und in der vielgestaltigsten Form in ihren Betrieben abspielen, einzudringen, sie alle kommen nicht mehr aus ohne eine gründliche Kenntnis der Enzyme und ihrer Wirkungen.

Dieser Grundgedanke leitete auch den Verfasser des vorliegenden Buches, das er in seiner Eigenschaft als Universitäts-

Digitized by Google

lehrer bearbeitete; derselbe Grundgedanke leitete auch mich, als ich mich entschlofs, das Werk ins Deutsche zu übertragen, um dessen Studium weiteren deutschen Kreisen zu erleichtern.

Das vorliegende Buch geht auf die Praxis der Industrien, in denen die Enzyme eine Rolle spielen, nicht ein; es ist rein wissenschaftlich-didaktisch gehalten und soll lediglich den Zweck erfüllen, den Studierenden in das so überaus interessante und wichtige Gebiet der Enzyme einzuführen. Es macht auch auf Vollständigkeit in Bezug auf Litteraturangaben durchaus keinen Anspruch; es scheint sogar, als ob sorgfältig aus dem Litteraturreichtum, den die Enzymologie heute bereits aufweist, nur das herausgeschöpft worden sei, was gerade notwendig ist zum Verständnis der Enzyme und ihrer wunderbaren Wirkungsweise. Gerade in dieser Beziehung zeichnet sich das vorliegende Buch vor ähnlichen inzwischen erschienenen aus, es verläuft sich weder einseitig in praktische Spekulationen und Erörterungen, noch erdrückt es den Leser durch die Unmenge von Meinungen und Ansichten, die bislang auf diesem Gebiete zu Tage getreten sind. Es ist eben ein Lehrbuch im reinem Sinn des Wortes, und gerade dieser Umstand hat mir sofort beim Erscheinen des Buches den Entschlufs geweckt, es ins Deutsche zu übertragen und in diesem Sinne für deutsche Studierende nutzbar zu machen. Ich zweifele nicht, dafs es in diesen Kreisen willkommene Aufnahme finden und wirklichen Nutzen stiften wird.

Mit diesem Wunsche übergebe ich die deutsche Ausgabe hiermit der Öffentlichkeit.

Berlin N., Institut für Gärungsgewerbe, Oktober 1900.

Wilhelm Windisch.

Digitized by Google

Inhalt.

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Kapitel XXII.

Die Ausscheidung der Enzyme.

Kapitel XXIII.

Die Konstitution der Enzyme.

Kapitel XXIV.

Die Wirkungsweise der Enzyme. Theorieen der Gärung.

Digitized by Google

Kapitel I.

Die Natur der Gärung und ihre Beziehungen zu den Enzymen.

Wie so viele Naturerscheinungen, die an die Gegenwart von Leben gebunden sind, so war auch die Gärung der Gegenstand sorgfältiger, sich über Jahrhunderte erstreckender Studien. Sie war der Gegenstand von Untersuchungen in der Hand vieler Forscher, und ihre Natur war das Thema heftiger Streitigkeiten. Hypothese auf Hypothese wurde aufgestellt, um die verschiedenen Erscheinungen, die sie bietet, zu erklären — jede derselben bezeichnete einen Fortschritt in der Erkenntnis, aber keine genügte, um das Ganze der beobachteten Thatsachen in befriedigender Weise zu erklären. Obgleich innerhalb der letzten 2 Jahrhunderte sehr wesentliche Fortschritte gemacht worden sind, so blieb doch noch vieles unaufgeschlossen.

Der Ausdruck Gärung wurde zuerst auf den Prozefs angewandt, der zur Bildung von Alkohol führt, dessen Kenntnis zurück auf ganz alte Zeiten geht. Der Name ist wahrscheinlich auf die reichliche Entwickelung von Gas zurückzuführen, die die Bildung des Alkohols begleitet und die der Flüssigkeit, in der sie stattfindet den Anschein eines leichten Kochens giebt.

Es ist nicht überraschend, dafs in früheren Zeiten sehr falsche Vorstellungen entstanden über die Natur des Prozesses, der mit dieser Erscheinung verknüpft war. Wo immer auch eine Entbindung oder Entwickelung eines Gases beobachtet wurde, führte man dies auf ähnliche Ursachen zurück. Daher finden wir auch, dafs einige der älteren Schriftsteller das Aufbrausen, welches entsteht, wenn eine Säure in Berührung mit Kreide gebracht wird, unter Gärung klassifizierten. Die Entwickelung von Gas in den

Digitized by Google

tierischen Eingeweiden wurde in zutreffenderer Weise für eine verwandte Erscheinung gehalten.

Obgleich viele der so gruppierten Reaktionen wenig Gemeinsames besafsen, so wurde doch ein Prozefs, der schon sehr früh bekannt war, in zutreffender Weise mit der Gärung in Verbindung gebracht. Dies war die Wirkung des Sauerteiges bei der Brotbereitung. Die Entwickelung von Gas wurde beobachtet in Verbindung mit dem Aufgehen des Teiges, obgleich weiter keine Ähnlichkeit mit der alkoholischen Gärung erkannt wurde. In der That entstanden über den Sauerteig und seine Wirkung die wildesten Spekulationen; einige Schriftsteller vergleichen ihn mit dem hypothetischen Stein der Weisen und schreiben ihm die Kraft zu, den Teig in eine ihm (dem Sauerteig) ähnliche Masse zu verwandeln.

Eine Thatsache von Wichtigkeit schälte sich doch aus dieser Wirrnis heraus, obgleich ihre Erklärung viel zu wünschen übrig liefs. Das war die Entdeckung, dafs eine sehr kleine Menge Sauerteig im stande war eine fast unbegrenzte Masse Teig in Gärung zu versetzen oder umzuwandeln. Man nahm jedoch an, dafs letzterer dabei in Sauerteig verwandelt würde.

Ein anderer Punkt der Übereinstimmung zwischen diesen beiden Gärungsprozessen wurde ebenfalls verhältnismäfsig früh erkannt. Gerade wie die Luftbildung im Teig bedingt war durch die Gegenwart von Sauerteig, so fand man, dafs die alkoholische Gärung begleitet war von der Bildung eines Niederschlages in der gärenden Flüssigkeit, der manchmal in der Form eines Bodensatzes, manchmal in der Form eines auf der Oberfläche schwimmenden Schaumes in die Erscheinung trat. Von manchen Schriftstellern wurde diesem manchmal eine grofse Bedeutung beigelegt, und dem Sauerteig wurde sogar eine gewisse geheime Kraft zugeschrieben, vermöge deren er die Veränderungen bewirken konnte, die man in der Flüssigkeit beobachten konnte. Er wurde infolgedessen als Ferment bezeichnet.

Die wahre Natur dieser Ausscheidung, wie die des Sauerteiges, wurde während einer langen Zeit nicht erforscht, noch verstand man die Rolle, die er spielte.

Um das Ende des 16. Jahrhunderts wurde der Prozefs der Fäulnis in Verbindung gebracht mit den beiden bereits erwähnten

Digitized by Google

Gärungen und gezeigt, dafs die drei viel Gemeinsames haben. Die Verwirrung jedoch, die zu der Verknüpfung der drei Gärungen mit der Erscheinung des Aufbrausens führte, hielt eine beträchtliche Zeit an. Erst im Jahre 1659 stellte *de la Boë* fest, dafs sie sich wesentlich von der Erscheinung des Aufbrausens unterscheiden; die Hauptreaktion der letzteren sei eine Kombination, während sie im Fall der Gärung eine Zersetzung ist.

Den ersten klaren Ausspruch über die alkoholische Gärung that *Becher* im Jahre 1682; er bezeichnet einen Abschnitt in der Entwickelung unserer Kenntnisse über diesen Gegenstand. Dieser Forscher behauptete, dafs nur zuckerhaltige Flüssigkeiten der alkoholischen Gärung fähig seien, und er zeigte, dafs der Alkohol nicht als solcher in dem ursprünglichen Weinmost existiere, wie man angenommen hatte, sondern während des Gärungsvorganges gebildet wird. *Becher* nahm an, dafs er durch eine Art Verbrennung des Zuckers gebildet werde; auch behauptet er, dafs Luft zur Ingangsetzung der Erscheinung nötig sei.

Um dieselbe Zeit wurde der Bodensatz oder der Schaum, der als eine unveränderliche Begleiterscheinung der Gärungen beobachtet worden war, von *Leuwenhoek* mikroskopisch untersucht, welcher zeigte, dafs er sich aus kleinen, eiförmigen oder runden Kügelchen zusammensetze; er war jedoch nicht im stande ihre Natur zu bestimmen.

Obgleich das Thema ziemlich heftig diskutiert wurde und verschiedene Theorieen aufgestellt wurden, um die beobachteten Erscheinungen zu erklären, so war während des folgenden Jahrhunderts nur wenig wirklicher Fortschritt zu verzeichnen. Die Essiggärung wurde entdeckt, und man beharrte auf der Ähnlichkeit zwischen Fäulnis und Gärung im allgemeinen. Doch blieb die Natur der *Leuwenhoek*schen Kügelchen unaufgeklärt; viele Beobachter, insbesondere *Fabroni*, hielten sie für tierischen Ursprunges. Die Arbeiten von *Lavoisier* gegen Ende des 18. Jahrhunderts warfen eine Fülle von Licht auf den Vorgang; dieser grofse Chemiker studierte quantitativ die Beziehungen des Zuckers zu den aus demselben während der Gärung gebildeten Produkten und kam zu dem Schlufs, dafs der Vorgang in einer Spaltung des Zuckers in 2 Teile besteht, von denen der eine zu Kohlensäure oxydiert, während der andere in Alkohol umgewandelt

Digitized by Google

wird. Er sagte, dafs, wenn es möglich wäre, diese 2 Körper wieder miteinander zu verbinden, alsdann wieder Zucker gebildet würde.

Um das Jahr 1815 legten Analysen von *Gay-Lussac*, *Thénard* und *de Saussure* endgiltig die Zusammensetzung des Zuckers und des Alkohols fest. Während der ersten Jahre des gegenwärtigen Jahrhunderts waren in der That die Ansichten von *Lavoisier* der Ausgangspunkt vieler Untersuchungen vom chemischen Standpunkte aus; die Arbeiten zielten darauf ab, die Veränderungen zu bestimmen, die mit dem Zucker vorgingen.

Während derselben Zeit wurden von vielen Beobachtern Untersuchungen angestellt über die Natur der Kugeln und ihre Beziehung zur Gärung. *Astier* im Jahre 1813 und *Desmazières* im Jahre 1826 neigten zur Ansicht *Fabronis*, dafs sie tierischen Ursprungs seien, *Astier* hielt dafür, dafs sie nur auf Kosten des Zuckers leben könnten, den sie zersetzten.

Kurz darauf sah *Cagniard de Latour*, der die Versuche *Leuwenhoeks* wiederholte, dafs die Kugeln aus einem bestimmten Organismus bestanden, der im stande war sich durch Sprossung zu vermehren und der augenscheinlich ins Pflanzenreich gehörte. Er zog den Schlufs, dafs sie wahrscheinlich die Kohlensäure entbinden und die Flüssigkeit durch die Wirkung ihres Wachstums vergären.

Diese Entdeckung, die in der That die Basis für die gegenwärtigen Ansichten über den beregten Gegenstand bildet, wurde auch fast gleichzeitig von *Schwann* zu Jena und von *Kützing* zu Berlin gemacht, die durch *Quevenne*, *Turpin* und *Mitscherlich* bestätigt wurden. Der Organismus wurde von einigen den Pilzen, von anderen den Algen zugezählt, seine wahre systematische Stellung wurde erst durch *Meyen* festgelegt, der ihn als einen Pilz bezeichnete und ihn in einem neuen Genus unterbrachte, dem er den Namen Saccharomyces beilegte.

Diese Untersuchungen legten den Grund für die vollständigeren und zufriedenstellenderen Ansichten *Pasteurs*, dessen Untersuchungen so reiches Licht auf den ganzen Gärungsprozefs geworfen haben. Die Verbindung eines bestimmten Organismus mit der Zersetzung des Zuckers und der Gedanke, dafs die letztere in einem gewissen Zusammenhang stehe mit der Äufserung seiner

Digitized by Google

Lebensprozesse, entrückten die Frage dem Bereich der Chemie im engeren Sinne und wiesen ihr einen Platz an unter den Problemen der Physiologie. *Pasteur*, der den Gegenstand von letzterem Gesichtspunkt aus studierte, machte die sehr interessante Entdeckung, dafs die Bildung von Alkohol begleitet ist von einer gleichzeitigen Bildung von Glycerin und Bernsteinsäure, und er bestimmte durch quantitative Methoden, dafs ungefähr 4% des Zuckers, der während der Gärung verschwindet, zur Bildung dieser beiden neuen Produkte verbraucht wird.

Pasteur kam zu dem Schlufs, dafs die Ausübung der Fermentativkraft durch die Saccharomyceten oder die Hefe in Verbindung stand mit der Ernährung bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff, und dafs sie in der That der Ausdruck der Anstrengung des Organismus sei, sich Sauerstoff zu verschaffen bei Ausschlufs einer freien Sauerstoffzufuhr. Im Zusammenhange hiermit möge an einige Untersuchungen von *Lechartier* und *Bellamy* erinnert werden. Diese Forscher stellten eine Anzahl Versuche an mit reifen zuckerhaltigen Früchten, die sie mehrere Monate in einer sauerstofffreien Atmosphäre hielten. Unter diesen Bedingungen gaben die Früchte beständig eine gewisse Menge Kohlensäure ab, und am Ende der Untersuchungszeit enthielt das Fruchtfleisch eine mefsbare Menge Alkohol. Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dafs diese Gärung bei Abwesenheit von Hefezellen stattfand und thatsächlich durch die lebende Substanz der Zellen des Fruchtfleisches bewirkt wurde. *Pasteur* bestätigte diese Beobachtungen und betrachtete sie gleichzeitig als eine Bestätigung seiner Hypothese.

Schützenberger hat heftig gegen die Anschauung argumentiert, dafs die Zersetzung des Zuckers in Beziehung gebracht werde mit dem Atmungsprozefs der Hefe; er wollte sie lieber als mit der Ernährung der Hefe im Zusammenhange stehend betrachtet wissen. Eine Besprechung dieses Punktes mufs jedoch einem späteren Kapitel vorbehalten bleiben.

Obgleich die Ansichten der *Pasteur*schen Schule nicht sofort allgemeine Anerkennung fanden, indem sie z. B. bei *Liebig* und *Nägeli* heftigen Widerspruch fanden, die beide einer Theorie der molekularen Vibration zur Erklärung der Zersetzung des Zuckers das Wort redeten, so unterliegt es jetzt doch keinem Zweifel mehr,

Digitized by Google

dafs das lebende Plasma der pflanzlichen Zelle die letzte Ursache des Gärungsprozesses ist und dafs letzterer der Ausdruck der Gärthätigkeit in Verbindung mit der Erhaltung des Lebens ist. Dafs dies nicht eine spezifische Eigentümlichkeit des Protoplasmas der Hefezelle ist, dafs vielmehr diese Eigentümlichkeit auch höheren Pflanzen eigen ist, ist gleicherweise klar erwiesen worden durch die Arbeiten von *Lechartier* und *Bellamy*, auf die schon hingewiesen wurde.

Der Einflufs der lebenden Hefezellen in der Gärung oder im Sauerteig und der anderen pflanzlichen Organismen in den Fäulnisprozessen, der im laufenden Jahrhundert festgestellt wurde, zeigt, wie wesentlich ähnlich diese Prozesse der alkoholischen Gärung sind. Man fand, dafs die Mikroorganismen im stande sind noch viele andere, diesen ähnliche Zersetzungen hervorzurufen.

Während *Pasteurs* Ansichten sich allmählich selbst Bahn brachen, erfolgten in anderer Richtung hin Arbeiten, die bestimmt waren, unsere Kenntnisse über den vorliegenden Gegenstand wesentlich zu erweitern. Ganz zu Anfang dieses Jahrhunderts (1814) beobachtete *Kirchhoff*, dafs keimende Gerste einen Stoff enthielt, der im stande war, Stärkekleister zu verzuckern, und dafs bei diesem Prozefs eine Art Zucker erzeugt wird. *Kirchhoff* schrieb diese Funktion den Eiweifsstoffen oder dem Gluten der Gerste zu. Im Jahre 1823 wurde diese Beobachtung von *Dubrunfaut* wiederholt, und im Jahre 1833 extrahierten *Payen* und *Persoz* aus keimender Gerste die Substanz, die diese Zersetzung bewirkte. Sie teigten das Korn einige Zeit in Wasser ein und filtrierten den Extrakt ab. Beim Zufügen eines Überschusses von Alkohol zum Filtrat erhielten sie einen weifsen flockigen Niederschlag, der nach dem Trocknen und Wiederauflösen in Wasser im stande war, Stärkekleister in Zucker zu verwandeln. Die Veränderung, die diese Substanz, die sie Diastase nannten, bewirkt, hielt man für eine Art Gärung. Sie schien in derselben Weise zu wirken wie die „Kügelchen“ von *Leuwenhoek*, deren Natur damals noch unbestimmt war, wie bereits erwähnt wurde. Gleichzeitig war es aber zweifellos eine unorganisierte Substanz, wenn auch nur sehr wenig mit Sicherheit darüber bekannt war. Man bezeichnet sie deshalb als unorganisiertes Ferment.

Zwei Jahre früher hatte *Leuchs* beobachtet, dafs Speichel

Digitized by Google

dieselbe Eigenschaft besitzt wie die gekeimte Gerste, dafs er nämlich im stande war, Stärkekleister in Zucker zu verwandeln. Im Jahre 1845 zeigte *Mialhe*, dafs aus diesem animalischen Sekret nach der gleichen Methode eine Diastase hergestellt werden konnte, wie sie von *Payen* und *Persoz* im Gerstenauszug gefunden worden war.

Dieser Entdeckung folgten andere. Im Jahre 1836 wies *Schwann* Pepsin im Magensafte nach und zeigte, dafs es nicht diffusibele Eiweifsstoffe in andere umwandelte, die im stande waren, durch Membranen hindurchzugehen. *Berthelot* fand, dafs ein wässeriger Hefenauszug, der ganz frei von Hefezellen war, im stande war, Rohrzucker in zwei andere Zucker von einfacherer Zusammensetzung zu verwandeln. *Liebig* und *Wöhler* entdeckten eine ähnliche Substanz in den Mandelkernen, die Amygdalin unter Bildung von Zucker und anderen Körpern zersetzte, und auch sie überraschte die Ähnlichkeit dieses Prozesses mit der alkoholischen Gärung. Um das Jahr 1860 stellte *Brücke* aus der Magenschleimhaut das zuerst von *Schwann* beobachtete „Ferment" dar, das unlösliche Eiweifsstoffe spaltet und zur Bildung des löslichen Peptons Anlafs giebt.

Bei allen diesen verschiedenen „Fermenten" erkannte man, dafs sie zu der lebenden Substanz der Tier- oder Pflanzenzelle in Beziehung standen und man kam alsbald zu der Ansicht, dafs sie im Leben der Organismen, aus denen sie extrahiert worden waren, eine wichtige Rolle spielten.

Es schien so, als existierten zwei Klassen von Fermenten: die eine repräsentierte einen lebenden Organismus, der nur während seiner eigenen Wachstums- und Vermehrungsprozesse arbeitete; die andere bestehend aus Substanzen, die durch Lösungsmittel den Zellen entzogen werden konnten, in denen sie gebildet wurden und die im stande waren, aufserhalb der Lebenssphäre dieser Zellen Zersetzungen zu bewirken. Die beiden Kategorieen wurden folgerichtig organisierte und unorganisierte oder lösliche Fermente genannt. Für letztere Klasse wendet man jetzt allgemein den Ausdruck Enzyme an.

Beim Studium dieser verschiedenen Körper und ihrer gegenseitigen Beziehungen wird ersichtlich, dafs man seine Aufmerksamkeit den Lebenserscheinungen des Plasmas zuwenden mufs, ebenso den Veränderungen, die in ihrer Substanz während ihrer

Digitized by Google

Lebensäufserung zu Tage treten. Die Arbeiten der letzten Jahre haben auf die verschiedenen Vorgänge, die sich in den Zellen abspielen, helles Licht geworfen, und wir wissen jetzt, dafs diese in der Hauptsache, wenn nicht ganz, von dem Verhalten der lebenden Substanz reguliert werden.

Über die Anordnung des lebenden Protoplasmas sind verschiedene Ansichten entwickelt worden. Obwohl man hierüber keineswegs noch etwas Endgiltiges sagen kann, so ist die Annahme doch gerechtfertigt, dafs es in der Form eines Netzwerkes angeordnet ist, dessen Maschen mit einem diesen ähnlichen Material ausgefüllt sind, das jedoch nicht lebend ist. Das Haupt-Charakteristikum des Protoplasmas ist dessen Unbeständigkeit. Es unterliegt fortgesetzt der Zersetzung und der Neubildung. Seine Zersetzungsreste können zum Teil wieder zum Aufbau seiner eigenen Substanz verwendet werden, zum Teil werden sie abgestofsen. Von diesen werden einige ganz aus dem Organismus entfernt, andere werden dann zurückbehalten und zur Durchführung untergeordneter Lebens- oder Ernährungsprozesse benutzt.

Eine tierische oder pflanzliche Zelle ist mithin der Mittelpunkt einer sehr lebhaften Thätigkeit; in ihr wird Material für das Wachstum der lebenden Zelle eingelagert oder ihr zugeführtes Material zubereitet und einer Einlagerung zugänglich gemacht. Andererseits kann wiederum ein Teil ihrer Substanz eine Zersetzung erleiden behufs Erzeugung der Energie, die nötig ist zur Unterhaltung der Lebensprozesse.

Die dadurch bewirkten chemischen Veränderungen können dreierlei Art sein. Die Umsetzungen können der Anlafs sein, dafs Material in die aktive Substanz des Protoplasmas eingelagert und infolgedessen verschiedene Reste aus letzterem abgespalten werden. Auf diese Weise scheinen die verschiedenen Enzyme, so z. B. auch die Diastase, zu entstehen; auch die Bildung von Fett, Stärke und anderen Verbindungen, die in den verschiedenen Zellen angetroffen werden, kann auf diese Weise bewirkt werden Andere Vorgänge können sich abspielen, ohne dafs eine derartige nahe Beziehung zum Protoplasma in die Augen fällt. Sie können von dem Protoplasma aufserhalb seiner eigenen Substanz hervorgerufen werden, wobei die in Mitleidenschaft gezogenen

Digitized by Google

Stoffe dem Protoplasma nicht eingelagert werden. Derartige Zersetzungen sollen nach der Ansicht verschiedener Forscher durch die fermentative Thätigkeit des Plasmas selbst verursacht werden.

Eine dritte Art von Reaktionen kann sich abspielen in der Zelle ohne die thätige Mitwirkung des Protoplasmas überhaupt. Es ist wahrscheinlich, dafs Oxydations- und Reduktionsprozesse stattfinden in den Substanzen, die die Maschen des protoplasmatischen Netzwerkes ausfüllen und dafs die Zelle, so unthätig sie auch erscheinen mag, doch der Sitz vieler derartiger chemischer Reaktionen ist. So benötigt die Bildung des Zuckers in den Blätterzellen unter dem Einflufs des Chlorophylls, welches wahrscheinlich die Polymerisation gewisser Aldehyde bewirkt, keineswegs der Mitwirkung der lebenden Substanz, da eine derartige Polymerisation sehr häufig unter den Aldehyden angetroffen wird.

Einige der Zersetzungen der letzteren Art können von den anderen dadurch unterschieden werden, dafs, obwohl Plasma bei der Hervorbringung derselben nicht unmittelbar beteiligt ist, dieses doch aus seiner eigenen Substanz das die Umwandlung bewirkende Agens hervorbringt. Die Ausscheidung oder Bildung dieses neuen Faktors gehört in die erste Klasse der aufgezählten Reaktionen, aber das einmal ausgeschiedene Material ist mit der Fähigkeit ausgestattet, die in Frage stehenden Zersetzungen einzuleiten und durchzuführen. Der letzte Zweck der Sekretion ist gewöhnlich, wenn auch nicht notwendigerweise, die Verdauung gewisser Nährstoffformen, um diese für die Einlagerung in die lebende Substanz selbst vorzubereiten. Bis jetzt sind so viele dieser Körper bekannt, dafs es nicht ungerechtfertigt erscheint, zu sagen, dafs alle Zersetzungen dieser Art in letzter Instanz durch einen derartigen Mechanismus zu stande gebracht werden. Die Zahl der Fälle, in denen die direkte Mithilfe des Protoplasmas nötig erscheint, wird stets kleiner, je weiter die Arbeiten über den Metabolismus fortschreiten. Unsere Kenntnisse in dieser Beziehung wurden in den letzten zwei Jahren von *Buchner* wesentlich erweitert, der den Nachweis erbracht hat, dafs selbst der am frühesten bekannte fermentative Prozefs, die Bildung von Alkohol aus Zucker, von einem „löslichen Fermente“ durchgeführt wird, das aus der Hefezelle ausgezogen werden kann.

Digitized by Google

Von den Aufbauprozessen, die sich in der Zelle abspielen, weifs man nicht so genau, ob sie sich auf solche Sekretionen gründen. In vielen Fällen, in denen ein Aufbau zusammengesetzter Körper aus verhältnismäfsig einfachen Substanzen in der Zelle stattfindet, vollzieht sich dieser unter der direkten Mitwirkung des Protoplasmas. Das Studium der Gärung führt jedoch in der Hauptsache zu Abbauprozessen, wobei zusammengesetzte Substanzen in einfache abgebaut werden. Auf diesen Punkt kommen wir später zurück.

Wir können folgerichtig fürs erste die Gärung definieren als den Abbau komplexer organischer Stoffe in Körper von einfacherer Zusammensetzung entweder unter der Wirkung des Protoplasmas selbst, oder einer von diesem bewerkstelligten Sekretion.

Wir finden Beispiele dieser beiden Methoden in einzelligen und mehrzelligen Organismen, sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich. Bei weitem die gröfsere Anzahl von Beispielen fermentativer Thätigkeit des Protoplasmas, ausgehend von ausgeschiedenen Enzymen, können wir unter den sogenannten organisierten Fermenten treffen, den Hefen und der grofsen Gruppe von Mikroorganismen, den Schizophyten. Diese Pflanzen sind in der That von so hervorragender Wirkung in Bezug auf die Erregung von Zersetzungen, dafs sie ursprünglich als die einzigen „Fermente" betrachtet wurden, so dafs die Thatsache, dafs die Gärung nur neben dem eigentlichen biologischen Prozefs herlief, fast unbemerkt blieb. Die Theorie, dafs die Kraft oder die Eigenschaft, Zersetzungen zu erregen, sie zu einer von anderen. höheren Pflanzen biologisch verschiedenen Klasse stempelt, ist gänzlich durch die Entdeckung widerlegt, dafs viele derselben die ihnen eigentümlichen Zersetzungen mit Hilfe von Enzymen bewirken, die mit derselben Leichtigkeit aus ihnen dargestellt werden können als aus den höheren Pflanzen selbst. Noch mehr: die Enzyme, die sie aussscheiden, sind mit denen der höheren Pflanzen identisch.

Hieraus folgt, dafs jene Gärungsprozesse, bei denen das Protoplasma direkt beteiligt ist, intracellular sind. Erst verhältnismäfsig spät ist dies bei pflanzlichen Organismen nachgewiesen worden. Die Gegenwart einer Zellwand, die die lebende

Digitized by Google

Substanz umschliefst, würde den Kontakt verhindern, der zur Hervorbringung der beobachteten Zersetzung aufserhalb notwendig ist. Dieses Faktum mufs noch für viele der Bakteriengärungen besonders hervorgehoben werden. Nicht nur in einzelligen, auch in vielzelligen Organismen kann diese Beobachtung gemacht werden. Beispiele hierfür sind die alkoholischen Gärungen in reifen Früchten, die von *Lechartier* und *Bellamy* beobachtet und neuerdings von *Gerber* studiert wurden: ferner die Umwandlung des Glykogens in Zucker in den Muskeln und möglicherweise in der Leber der höheren Tiere, obwohl es nicht gewifs ist, ob die letztere nicht vielleicht der Sitz einer Gärung ist, die durch eine Diastase bewirkt wird; ferner die Peptonisation der Eiweifsstoffe der Gerste und anderer Getreidearten während der Keimung. Das Vermögen verschiedener Bakterien, Säuren zu bilden, besitzen auch die Zellen des saftigen Parenchyms der höheren Pflanzen. Obwohl Essigsäure durch *Mycoderma aceti* aus dem Alkohol gebildet wird und das Parenchym die Säuren, die es enthält, aus dem Zucker zu bilden scheint, so ist das Protoplasma doch in beiden Fällen das wirksame Agens. Die Säuren sind im letzteren Falle weniger einfach, das ist aber jedenfalls in dem Charakter des Metabolismus der beiden bezüglichen Arten von Zellen begründet.

Wenden wir uns wieder den Fermentationsprozessen zu, die mit Hilfe von Enzymen bewirkt werden, so finden wir hier verwickelte Verhältnisse. In den einfachsten Fällen einzelliger Pflanzen und Tiere ist die intercellulare Fermentation ganz allgemein. Die komplexe Substanz, die gewöhnlich ein Nährstoff ist, wird in die Zelle aufgenommen; erst wird ein Enzym ausgeschieden, dann erfolgt die Umwandlung. Aus sehr vielen einzelligen Pflanzen sind Enzyme extrahiert worden, die zu Lebzeiten der Pflanze nicht herausgeholt werden konnten, die aber für verschiedene chemische Reaktionen innerhalb der Zelle verantwortlich gemacht werden müssen. Bei anderen Zellen ist die Wahrscheinlichkeit grofs, dafs sie andere Enzyme enthalten, obgleich diese niemals extrahiert werden konnten. So ist z. B. beim Verdauungsprozefs gewisser einzelliger Tiere, — Amöbe, Carchesium und Actinosphaerium — festgestellt worden, dafs das verschluckte Futter bald nach seiner Absorption von einer Vakuole umgeben

Digitized by Google

wird, die eine saure Flüssigkeit enthält, und das sich allmählich unter dem Einflufs des Vakuolen-Inhaltes auflöst, genau in derselben Weise, wie ein ähnliches Rohmaterial im Reagensglas durch künstlichen Bauchspeichel verdaut werden kann.

Aber der intercellulare Verdauungsprozefs ist nicht der einzige. Viele Zellen scheiden das Enzym nach seiner Bildung in das umgebende Medium aus, wo es die Stoffe, die der Organismus nachher aufnimmt, zersetzt. In dieser Weise verhalten sich viele Bakterien, doch findet sich diese Erscheinung mehr bei vielzelligen Lebewesen, sowohl Tieren als Pflanzen. Solange eine einzige Zelle oder Masse den ganzen Organismus ausmacht, vollziehen sich seine metabolischen und Ernährungs-Prozesse in seiner ganzen Substanz. Wenn sich jedoch die Zellen in dem Organismus vervielfältigen und sich Glieder und Organe entwickeln, so bilden sich besondere Zellen für die Bereitung der Enzyme aus. Anderen hinwiederum fällt die ausschliefsliche Arbeit der Nahrungsaufnahme zu. Es leuchtet ein, dafs in diesen Fällen eine Nutzbarmachung der Enzyme nur möglich ist, wenn sie von dem Organismus ausgeschieden werden und derartig arbeiten können, dafs die Produkte, die sie bilden, leicht in die Absorptions-Region gebracht werden können. So scheiden z. B. die Drüsenzellen im menschlichen Verdauungstraktus ihre Enzyme nach aufsen ab; der Ernährungsvorgang mufs aus mancherlei Gründen lediglich als ein Intussusceptionsprozefs aufgefafst werden.

Die Unterscheidung, die man früher, wie bereits erwähnt, zwischen organisierten und unorganisierten Fermenten machte, ist, wie man sieht, irreführend. Der fundamentale Unterschied der bei dem Vergleich der beiden Arten von Thätigkeit in die Augen fällt, ist in Wirklichkeit nur ein Unterschied in der Differentiation des Organismus. Das einzellige Lebewesen scheint in den meisten Fällen seine Arbeit innerhalb seiner ganzen Substanz zu verrichten und da der Umfang der Umwandlungen, die es hervorbringt seine eigenen Gröfsenverhältnisse weit übertrifft, so erscheint es nur als ein Etwas, das in gewissen organischen Verbindungen grofse Umwandlungen hervorruft, wobei die Thatsache, dafs diese nur mit seinen eigenen Lebensbedürfnissen zusammenfallen, übersehen wird. Da der mehrzellige Organismus nur einen bestimmten, gewöhnlich sehr kleinen Anteil seiner Substanz für

Digitized by Google

die Umwandlungen hergiebt, so können diese in ihren Endzwecken leicht als biologische erkannt werden. Sowohl die ein- als auch mehrzelligen Organismen führen ihre Arbeit mit denselben Mitteln durch: entweder fermentative Thätigkeit des Protoplasmas oder Bildung und manchmal darauffolgende Ausscheidung von Enzymen.

Das Studium der Gärung läuft daher in der Hauptsache auf eine Erforschung der zerstörenden oder abbauenden Kraft des Protoplasmas hinaus, die sich entweder direkt oder unter Zuhilfenahme von Enzymen entfaltet. Die Grenze kann vielleicht noch enger gezogen werden, denn, wie bereits bemerkt, in vielen Fällen, wo man annahm, dafs das Protoplasma direkt wirke, fand man, dafs dies unter der Mitwirkung enzymatischer Kräfte geschieht. Die verbesserten Methoden der Darstellung haben in vielen Fällen zur Isolierung von Enzymen geführt, wo man sie gar nicht vermutete. Viele Forscher haben nach dem Enzym gesucht, das Zucker in Alkohol verwandelt, und wie bereits erwähnt, sind diese Bemühungen von Erfolg gekrönt gewesen. Die Wichtigkeit dieser Entdeckung kann kaum hoch genug angeschlagen werden, da gerade die Hefezelle so lange ihre hervorragende Stellung als organisiertes Ferment behauptet hat. Es bleiben allerdings noch viele Fälle übrig, in denen die Existenz eines Enzyms nur Hypothese ist.

Wenn wir uns zur Betrachtung der Enzyme als einer besonderen Gruppe von Substanzen wenden, so finden wir, dafs einige allgemeine Eigenschaften ihnen gemeinsam sind, obwohl sich unter denselben grofse Unterschiede bemerkbar machen. Eine Besprechung ihrer möglichen oder wahrscheinlichen Zusammensetzung mufs einem späteren Kapitel vorbehalten bleiben; für jetzt können wir nur sagen, dafs es sehr schwer ist, mehr als Vermutungen hierüber aufzustellen, da wir weder ein Kriterium für ihre Reinheit, noch einen befriedigenden Beweis für ihre Existenz haben, es seien denn die Äufserungen ihrer Wirkung.

Ihre Wirkung ist hervorragend abhängig von der Temperatur; sie äufsert sich nicht bei niedrigen Temperaturen, die nahe dem Gefrierpunkte des Wassers liegen; mit der Steigerung der Temperatur wächst sie langsam, indem sie ihr Maximum erreicht bei einem Punkte, der für die einzelnen Enzyme etwas wechselt, der

Digitized by Google

aber zwischen 30 und 50° C. liegt; jenseits dieses sogenannten Optimums nimmt sie wieder allmählich ab und erlischt schliefslich ganz. Durch Einwirkung einer Temperatur von etwa 100° verlieren sie für immer ihre charakteristischen Eigenschaften und werden zerstört oder zersetzt. Der zerstörende Einflufs dieser hohen Temperatur hängt augenscheinlich von der Gegenwart von Wasser ab, denn in vollkommen trockenem Zustand halten sie viel höhere Temperaturen aus.

Man nimmt im allgemeinen an, dafs sie sich an den Reaktionen, die sie bewirken, nicht weiter beteiligen, sondern dafs sie Umwandlungen hervorrufen, ohne dabei selbst irgend welche Veränderung zu erfahren. Ferner werden sie durch ihre eigene Thätigkeit nicht zerstört. Die Energie, die sie bei der Arbeit entfalten, rührt nicht von einer Zersetzung ihrer Substanz her.

Gewisse Thatsachen, die neuerdings beobachtet wurden, lassen einen gewissen Zweifel über die Richtigkeit dieser allgemeinen Annahmen berechtigt erscheinen, die Besprechung hierüber mufs jedoch einem späteren Kapitel vorbehalten bleiben.

Die Enzyme zeigen sich in gewisser Beziehung empfindlich gegen ihre Umgebung. Insbesondere ist von grofsem Einflufs auf sie die Reaktion der Lösungen, in denen sie arbeiten; einige sind nur in saurer, andere in neutraler und wieder andere in alkalischer Lösung wirksam. Aber nicht allein ihre Thätigkeit wird davon beeinflufst, denn leichte Änderungen in der Zusammensetzung eines für sie günstigen Mediums haben nicht nur eine Hemmung ihrer Thätigkeit, sondern sogar ihre eigene Zerstörung zur Folge. Ihre Thätigkeit wird aufserdem verzögert und schliefslich aufgehoben durch die Gegenwart eines Überschusses ihrer Stoffwechselprodukte.

Man hat die Enzyme eingeteilt nach den Medien, in denen sie arbeiten. Nachstehende Gruppen erscheinen wohl begründet:

1. Enzyme, die unlösliche Kohlenhydrate verschiedener Art umwandeln und schliefslich in löslichen Zucker überführen: die verschiedenen Formen der Diastase, die Stärke und ihre Verwandten angreift, Inulase, die Inulin abbaut, Cytase, die Cellulose hydrolysiert.

2. Enzyme, die Zuckerarten vom Biosetypus in einfachere Zucker, gewöhnlich Hexosen, umwandeln: Invertase, die den

Digitized by Google

Rohrzucker angreift, Glukase, die Maltose spaltet und andere, die andere Biosen spalten.

3. Enzyme, die Glukoside spalten, wobei Zucker und verschiedene andere Körper entstehen. Hierher gehören Emulsin, Myrosin und mehrere andere.

4. Die proteolytische Gruppe, deren Angehörige verschiedene Formen unlöslicher Eiweifsstoffe zersetzen. Unter diesen spielen Pepsin und Trypsin in der tierischen Verdauung eine hervorragende Rolle.

5. Die Gerinnungsenzyme, die aus verschiedenen löslichen Körpern gallertartige Substanzen bilden, wobei die Flüssigkeit, in der sie gelöst sind, koaguliert. Hierzu sind zu zählen: Käselab, das Milch koaguliert, Thrombase, die bei der Koagulation des Blutes eine Rolle spielt, und Pektase, die der wirksame Faktor bei der Bildung vegetabilischer Gallerten ist.

6. Das Enzym, das Öle oder Fette spaltet, das man neuerdings Lipase benannt hat.

7. Oxydasen, oder oxydierende Enzyme, die, wie ihr Name besagt, bei der Oxydation verschiedener Substanzen wirksam sind. Unter diesen sind zu nennen: Lakkase und Tyrosinase.

Die Aufzählung ist keine vollständige, denn man kennt noch andere Enzyme, die allerdings eine isolierte Stellung einzunehmen scheinen. Unter diesen möge die Urease genannt sein, die aus Harnstoff kohlensaures Ammoniak bildet, und das Alkohol bildende Enzym Zymase von *Buchner*.

Digitized by Google

Kapitel II.

Diastase (Amylase, Ptyalin).

Von den löslichen Fermenten oder Enzymen ist die Diastase am längsten bekannt. *Kirchhoff* machte im Jahre 1814 zuerst die Beobachtung, dafs keimende Gerste einen Stoff enthält, der, wenn man ihn mit Wasser auszieht, im stande ist, Stärke in Zucker überzuführen. Man betrachtete diese Fähigkeit damals als eine besondere Eigenschaft des Glutens des Gerstenkornes und setzte sie nicht auf Rechnung eines besonderen Bestandteiles der Gerste. Doch nahm man einige Jahre lang wenig Notiz von der Entdeckung; im Jahre 1823 jedoch wiederholte *Dubrunfaut* die Beobachtung und erweiterte sie, indem er feststellte, dafs die Umwandlung sehr leicht vor sich geht bei einer Temperatur von 65° C. und dafs der dabei gebildete Zucker gärfähig ist. Im Jahre 1831 entdeckte *Leuchs*, dafs auch Speichel die Fähigkeit besitzt, Stärke in Zucker überzuführen.

Diese Beobachtungen ebneten den Weg zu den Arbeiten von *Payen* und *Persoz*, die zuerst die Diastase aus den Auszügen der gekeimten Gerste darstellten. Im Jahre 1833 teigten diese Forscher gemahlene gekeimte Gerste einige Zeit in Wasser ein, filtrierten den Auszug ab und fällten aus dem Filtrat mittelst Alkohol einen flockigen Niederschlag aus, der nach dem Trocknen und Wiederauflösen dieselben Fähigkeiten besafs, wie der ursprüngliche Auszug. *Payen* und *Persoz* erweiterten ihre Beobachtungen, indem sie denselben Körper im Hafer, Weizen, Mais und Reis während des Keimprozesses entdeckten, ebenso in den wachsenden Kartoffelknollen.

Der durch Alkohol ausgefällten Substanz wurde von den Entdeckern der Name Diastase gegeben.

Digitized by Google

Der Beobachtung von *Leuchs* im Jahre 1831 folgte die von *Mialhe* im Jahre 1845, der den Speichel derselben Behandlung unterwarf, der *Payen* und *Persoz* den Grünmalzauszug unterzogen hatten. Er fügte zum Speichel absoluten Alkohol im Überschufs und erhielt einen Niederschlag, der, wie die vegetabilische Diastase, stärkeverzuckernde Kraft besafs.

Er nannte diesen Körper Speichel-Diastase, um damit die Ähnlichkeit, nicht aber die Identität mit dem von *Payen* und *Persoz* dargestellten Körper anzudeuten. Dieser Name ist in physiologischen Werken fallen gelassen worden, dafür hat der Name Ptyalin allgemein Platz gegriffen.

In demselben Jahre entdeckte man einen Körper mit denselben stärkeverzuckernden Eigenschaften in einem anderen tierischen Sekret, nämlich im Pankreassafte der Säugetiere. Die Entdecker waren *Bouchardart* und *Sandras,* die den Nachweis führten, dafs aus diesem Organ eine Art Diastase ausgezogen werden konnte.

So waren bereits frühzeitig drei Diastasequellen aufgethan, zwei tierischen und eine pflanzlichen Ursprunges. So lagen die Verhältnisse lange Zeit. In den letzten drei Jahrzehnten jedoch hat man erkannt, dafs die Diastase sowohl im Tier-, als auch im Pflanzenreich sehr weit verbreitet ist.

Was zunächst die Untersuchungen über die Vorgänge im Pflanzenleben anlangt, so nahm als Erster *Gorup-Besanez* im Jahre 1874 diesen Gegenstand in Angriff; dieser Forscher fand in mehreren anderen keimenden Samen das Enzym. Ihm folgte im Jahre 1877 *Kosmann*, 1878 *Baranetzky* und 1879 *Krauch.* Diese Forscher stellten durch ihre Untersuchungen fest, dafs die Diastase in den gewöhnlichen vegetativen Teilen der Pflanzen und aufser in den Samen in anderen ruhenden Teilen vorkommt. So stellten *Kosmann* und *Krauch* ihre Anwesenheit in den Blättern und Spröfslingen der höheren Pflanzen fest, ebenso in gewissen Algen, Flechten, Moosen und Pilzen, während *Baranetzky* sie sowohl in Knospen als in den Kartoffelknollen auffand. Diese Beobachtungen führten den letztgenannten Forscher zur Vermutung, dafs sie allgemein in den Pflanzenzellen anzutreffen ist, so lange diese noch leben.

Im Jahre 1884 wurde eine wichtige Untersuchung über

Digitized by Google

diesen Gegenstand von *Brasse* durchgeführt. Er stellte aus den Blättern von Kartoffel, Dahlia, Jerusalem-Artischoke, Mais, Rübe, Tabak und Ricinus Wasserauszüge her; auf Zusatz von Alkohol zu diesen Auszügen fiel ein flockiger Niederschlag aus, den er sammelte und trocknete. Dieses Pulver verflüssigte und verzuckerte Stärkekleister. Die Menge des gebildeten Zuckers wurde mit Kupferlösung bestimmt.

Brasse schlofs die Mitwirkung von Mikroorganismen bei seinen Versuchen aus, indem er sie bei Gegenwart von Spuren Chloroform durchführte, das das Wachstum dieser Organismen verhindert.

Die Untersuchungen vieler Forscher in neuerer Zeit haben die *Baranetzky*sche Vermutung als wahr bestätigt und unsere Kenntnisse über die Diastase so weit gefördert, dafs sie den Nachweis erbrachten, dafs in den Pflanzen mindestens zwei Arten von Diastase vorkommen.

Die erste ist die verbreitetste; sie spielt offenbar eine Hauptrolle bei dem Transport der Stärke von einer Stelle zur andern in der Pflanze und wird gewöhnlich in den vegetativen Organen angetroffen. Die andere ist fast immer, wenn nicht ausschliefslich, auf die keimenden Samen beschränkt, hauptsächlich die der Gräser, und ist wahrscheinlich der zuerst von *Payen* und *Persoz* dargestellte Körper. Diese beiden Arten Diastase hat man zur Unterscheidung Translokations- und Sekretions-Diastase genannt.

Die Translokationsdiastase.

Diese Diastase ist die am weitesten verbreitete; sie kommt nicht nur in den vegetativen Organen vor, sondern auch in den Samen während der Entwickelung des Keimlings. Ihre Wirkung auf Stärkekörner kann in den pflanzlichen Geweben selbst studiert werden; das Enzym kann aber auch aus den Geweben durch Wasser oder Glycerin ausgezogen werden; den Auszug kann man dann auf sein Verhalten gegen Stärkekleister oder Stärkelösung prüfen. Im ersteren Falle löst die diastatische Lösung die Stärkekörner, manchmal nur von aufsen her, manchmal auch von innen heraus, sie giebt aber niemals Anlafs zu irgend welchen Korrosionen, so dafs die Form und das Aussehen des Kornes fast bis

Digitized by Google

zur Zeit des Verschwindens unverändert bleiben. Wenn die Diastase auf einen dünnen Stärkekleister einwirkt (1 g Stärke auf 100 g Wasser), so wird die opalescierende Flüssigkeit allmählich durchsichtiger, bis sie ganz klar ist; die Stärke wird fast vollständig in Zucker umgewandelt. Wenn man statt des Stärkekleisters eine Stärkelösung nimmt, so vollzieht sich die Überführung in Zucker noch schneller. Nähere Angaben über diese Vorgänge werden in einem späteren Kapitel gemacht.

Die Wirkung dieser Diastase ist am energischsten bei einer Temperatur von 45—50° C.

Die Translokationsdiastase soll nach Angabe verschiedener Forscher in Blättern, Knospen und gewissen Reserveorganen vorkommen. Im Jahre 1889 fand sie *Kjeldahl* in ungekeimten Gerstenkörnern, eine Entdeckung, die im Jahre darauf von *Brown* und *Morris* bestätigt wurde. *Kjeldahl* zeigte, dafs, während ein Auszug aus ungekeimter Gerste eine Lösung von löslicher Stärke sehr rasch verzuckerte, seine Einwirkung auf Stärkekleister nur eine minimale war. *Brown* und *Morris* studierten die Bildung und Verteilung des Enzyms während des Reifeprozesses des Gerstenkornes. Es findet sich hauptsächlich im Endosperm und zwar in besonders reichlicher Menge stets in dem Teil des Endosperms, der dem jungen Embryo am nächsten liegt, und es scheint, als ob es das Material für die Ernährung des letzteren bei dessen Wachstum liefere. Es erscheint so in dem Gerstenkorn zu einem viel früheren Zeitpunkt als die andere Diastase, die später beschrieben werden soll, die nur nach der Reife und hauptsächlich erst zu Anfang des Keimprozesses auftritt. Die Translokations-Diastase erscheint bereits in einem sehr frühen Entwickelungsstadium des Endosperms und nimmt stetig zu, bis die Entwickelung vollendet, das Korn aber noch nicht reif ist. *Brown* und *Morris* bestimmten sorgfältig die Menge der im Gerstenkorn in drei verschiedenen Stadien der Entwickelung vorhandenen Diastase: 1. als das Endosperm halb entwickelt war, 2. als es zu zwei Drittel entwickelt war, 3. als es ganz entwickelt war. Die Menge der Diastase wurde bestimmt, indem man die Menge löslicher Stärke feststellte, die von einer gewissen Anzahl gemahlener Gerstenkörner innerhalb derselben Zeit und unter denselben Bedingungen verzuckert wurde. Die bezüglichen Mengen

Digitized by Google

verhielten sich wie 4,4 : 7,8 : 9,7, Zahlen, die zeigen, dafs mit dem wachsenden Embryo die in seiner Nähe befindliche Diastase pari passu wächst, was die Ansicht bestätigt, dafs das Enzym den Zweck hat, den Embryo zu entwickeln und zu ernähren.

Diese Art Diastase erscheint nicht nur in den Samen aufserhalb des Embryos, sondern mit Beginn des Wachstums des Embryos findet man sie auch in dessen Zellen, nicht so sehr in dem Kotyledon als in der Plumula und dem Würzelchen, den Teilen nämlich, in denen ein sehr lebhaftes Wachstum auftritt. Gerade in diesem frühen Stadium scheint sich *Baranetzky's* Ansicht, die Diastase sei ein notwendiger Bestandteil jeder pflanzlichen Zelle, zu bestätigen. Die Funktion dieses Diastaseanteiles steht in keinem Zusammenhang mit der Absorption von Zucker durch das Endosperm der Mutterpflanze, sondern mit Translokationen im Körper des Embryos selbst.

Die Diastase der Blätter und Knospen hat vieles gemein mit der des ungekeimten Kornes und scheint dieselbe Art zu sein. Das Verschwinden der Stärke aus den Pflanzenblättern während der Dunkelheit nach ihrer Bildung und Ablagerung in den Chloroplastiden bei Belichtung, ist stets mit der Gegenwart des Enzyms in Verbindung gebracht worden, obwohl eingehendere Untersuchungen über die Bedingungen des Verschwindens erst in neuerer Zeit gemacht wurden. Im Jahre 1890 wurde die Anwesenheit von Diastase in Laubblättern von *Wortmann* bestritten, der, da es ihm in vielen Fällen nicht gelang, die Diastase zu extrahieren, zu der Ansicht kam, dafs die Umwandlung der Blattstärke in Zucker unter der unmittelbaren Wirkung des Protoplasmas der lebenden Zelle selbst sich vollziehe und nicht unter dem Einflufs eines Enzymes. Dies führte zu einer Wiederaufnahme der Untersuchungen über die Stärke-Umwandlungen in den Blättern durch *Vines* sowie durch *Brown* und *Morris*, die das Ergebnis hatten, dafs die Beobachtungen von *Brasse* und anderer früherer Forscher vollauf bestätigt wurden. Ungefähr zu derselben Zeit veröffentlichte *Krabbe* eine ausführliche Abhandlung, in der er darlegte, dafs die Art der Lösung der Stärkekörner in der Zelle mit der übereinstimmt, die man beobachten kann, wenn die Stärkekörner aufserhalb der Pflanze mit Diastase behandelt werden.

Vines dehnte seine Untersuchungen in grofsem Mafsstabe

Digitized by Google

auf die Blätter der Gräser aus, die er mit Wasser extrahierte. Einige der Auszüge wurden filtriert, die anderen in trübem Zustand benutzt. Letztere waren wirksamer als erstere, eine Thatsache, die darauf hindeutet, dafs *Wortmann* einen guten Teil der in den Blättern enthaltenen Diastase durch die Filtration verlor, da das Enzym aus naheliegenden Gründen nicht vollständig in Lösung übergegangen war. *Vines* war im stande aus Grasblättern eine Diastaselösung herzustellen. die einen nicht unbeträchtlichen Gehalt an Diastase aufwies. Er nimmt an, dafs, obwohl der Gehalt an Enzym in irgend einem gegebenen Augenblicke klein sein kann, trotzdem eine konstante Sekretion oder Bildung des Enzyms stattfindet, so dafs die produzierte Gesamtmenge genügt, um alle translozierte Stärke während der Nacht zu verzuckern.

Die Arbeit von *Brown* und *Morris* erschien im Jahre 1893 und ist die vollständigste und eingehendste, die bis jetzt über die Diastase der Laubblätter veröffentlicht wurde.

Zunächst waren sie im stande, die scheinbare Abwesenheit der Diastase in vielen Blättern, die durch die sehr geringe diastatische Kraft der filtrierten Auszüge erwiesen schien, zu erklären. Sie trockneten Blätter verschiedener Pflanzen an der Luft bei einer Temperatur von 40—50° C, und zerrieben sie zu einem feinen Pulver. Aus zehn Gramm eines solchen Pulvers — bei dem in Rede stehenden Versuch wurden die Blätter von Helianthus tuberosus benutzt — wurde ein Auszug in der Weise bereitet, dafs es einige Zeit in Wasser eingeteigt wurde, dem eine Spur Chloroform zugegeben war. Schliefslich wurde der Auszug filtriert. Dann wurden zwei Verzuckerungsversuche in der Weise durchgeführt, dafs in einem Fall der Auszug, im anderen 10 Gramm nicht extrahierte, gepulverte Blätter zur Verzuckerung benutzt wurden. Die Wirkung der Diastase verhielt sich in beiden Fällen wie 7 : 1, wie durch Bestimmung des Kupferreduktionsvermögens festgestellt wurde.

Die Verfasser führen zwei Gründe zur Erklärung dieses Unterschiedes an: der erste ist, dafs das Plasma oft der Trennung von dem Enzym einen grofsen Widerstand entgegensetzt, der zweite, dafs der in den Blättern so häufig vorkommende Gerbstoff in vielen Fällen es unmöglich mache, das Enzym aus den Zellen zu extrahieren.

Digitized by Google

Brown und *Morris* untersuchten die Blätter von 34 Arten von Pflanzen, die einer grofsen Anzahl verschiedener Ordnungen entnommen waren, und fanden, dafs alle einen mefsbaren Gehalt an Diastase aufwiesen, obwohl sie unter einander sehr verschieden waren. Die Leguminosen waren besonders reich, unter diesen die gewöhnliche Erbse (Pisum sativum) in ganz hervorragendem Mafse; die diastatische Kraft derselben war fast halb so grofs wie die des Malzes.

Obwohl genaue quantitative Bestimmungen des Enzyms schwierig, wenn überhaupt möglich waren, so konnten vergleichende Bestimmungen doch leicht durchgeführt werden. Die Methode, die Menge der von einem Auszug unter bestimmten Bedingungen und in der Zeiteinheit verzuckerten Stärke festzustellen, liefert, wie *Kjeldahl* gezeigt hat, genaue Resultate; er formulierte ein „Proportionalitätsgesetz“, das so ausgedrückt werden kann:[1]) Wenn das Reduktionsvermögen K[2]) nicht unter 25—30 fällt, dann ist unter gleichen Zeit-, Temperatur- und Konzentrationsverhältnissen das Kupferreduktionsvermögen proportional der angewandten Diastasemenge.

Brown und *Morris* zeigten weiter, dafs die Diastase in den Laubblättern nicht nur vorhanden ist, sondern dafs ihre Menge auch von Zeit zu Zeit beträchtlich wechselt je nach den äufseren Verhältnissen. Hierüber handelt ein späteres Kapitel noch ausführlicher, für jetzt möge nur gesagt werden, dafs bei Dunkelheit beträchtliche Mengen gebildet werden und im hellen Sonnenschein eine bedeutende Verminderung stattfindet.

Die Arbeiten von *Brown* und *Morris* werden unterstützt durch die im gleichen Jahre veröffentlichten Untersuchungen von *St. Jentys.* Dieser fand, dafs die Diastase nur in kleinen Mengen gebildet wird, so viel als gerade davon gebraucht wird. Ein wässeriger Blätterauszug enthält gewöhnlich Gerbstoff, der die Stärke ausfällt. Letztere wird unter diesen Verhältnissen nur

---

[1]) *Brown* and *Morris.* „On the Chemistry und Physiology of Foliage Leaves“. Journal of the Chemical Society Transactions. 1893, S. 637.

[2]) K bedeutet scheinbare Dextroseprozente einer Substanz, bestimmt aus der Kupferreduktion. So heifst K_{25}, dafs die reduzierende Kraft der Substanz ein Viertel der der Dextrose ist.

Digitized by Google

schwer angegriffen. Aufserdem fällt der Gerbstoff auch noch die Diastase selbst.

Aufser in den aktiv vegetativen Teilen der Pflanze findet sich diese Diastase auch in den Behältern des Stärkematerials und hier besonders reichlich zu Beginn des Wachstumes.

Eine Untersuchung der Kartoffel durch *Prunet* hat mehrere interessante Thatsachen ans Licht gefördert in Bezug auf die Bildung und Verteilung dieser Art Enzym in dem Gewebe der Kartoffel. Im Anfang der Keimung der Kartoffelknolle kann man bemerken, dafs die Knospen in der Nähe der Knollenspitze sich rascher entwickeln als die tiefer gelegenen. *Prunet* trennte die verschiedenen Teile der sprossenden Kartoffel und stellte daraus wässerige Auszüge her. Er bestimmte die diastatische Kraft der verschiedenen Auszüge, indem er das Enzym mit Alkohol fällte, filtrierte, den Niederschlag auflöste und die Lösung auf dünnen Stärkekleister einwirken liefs. Seine Ergebnisse sind nur vergleichende und vielleicht nur annähernd richtige, da er den Fortgang der Verzuckerung einfach durch die Jodreaktion bestimmte. Die Stärke verschwindet bei der Verzuckerung, und die Farbe beim Versetzen der Stärkelösung mit Jod geht zunächst aus Blau in violett, dann in rot und schliefslich in farblos über. Diese Methode ist nicht so genau wie die der Zuckerbestimmung, sie liefert jedoch brauchbare Verhältnis-Zahlen. Er fand, dafs zwar Diastase in allen Teilen der keimenden Kartoffelknolle vorhanden ist, dafs jedoch die gröfste Menge sich an den Stellen befindet, in deren Nähe das gröfste Wachstum stattfindet. Der Beginn des Wachstums der jungen Schöfslinge geht Hand in Hand mit der Bildung des Enzyms in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft, und je länger sie werden, um so weiter zurück läfst sich die Diastase nachweisen. *Prunet* bestimmte gleichzeitig den in den einzelnen Kartoffelteilen vorhandenen Zucker und fand, dafs Beziehungen zwischen diesem und dem Enzym bestehen.

Im Jahre 1893 führte der Verfasser eine Reihe von Versuchen aus über den Keimprozefs der Pollenkörner verschiedener Pflanzen, und stellte das Vorhandensein dieser Diastase in mehreren Arten fest. In vielen der untersuchten Pollen fand sich Stärke, ebenso in den Geweben der bei der Keimung des Pollens auswachsenden Pollenschläuche. Die Diastase wurde nach den bereits

Digitized by Google

beschriebenen Methoden nachgewiesen und in den meisten Fällen vorgefunden.

Dasselbe Enzym wurde in dem Gewebe des Griffels in einigen der untersuchten Blüten nachgewiesen.

Die Menge der aus den Pollen ausziehbaren Diastase wechselt von Zeit zu Zeit beträchtlich. Zu Anfang der Keimung nimmt sie gewöhnlich zu, und sie scheint den Pollenschlauch in seiner ganzen Länge zu begleiten, was zu der Vermutung berechtigt, daſs ihre Bildung nicht nur in dem Korn, sondern auch im Schlauch selbst stattfindet. Wenn der Pollen seine Keimkraft beim Älterwerden verliert, so verliert er gleichzeitig seine Diastase. So läſst sich auch hier, ebenso wie bei der Kartoffel der Einfluſs des Enzyms auf den Keimprozeſs deutlich nachweisen.

Die Behauptung *Kosmann's*, daſs Diastase aus Pilzen extrahiert werden kann, blieb lange Zeit unbestätigt. Es schien auf den ersten Blick unwahrscheinlich, daſs sie dort vorkommen sollte, da diese Pflanzen keine Stärke führen. Sehr häufig hat man jedoch Glykogen in denselben gefunden, und da dieses der Stärke sehr ähnlich ist, so fällt dieser Grund weg.

Im Jahre 1883 stellte *Duclaux* über das Verhalten des Aspergillus niger unter verschiedenen Bedingungen Untersuchungen an; dabei stellte er fest, daſs dieser Pilz im stande ist, ebenso wie gekeimte Gerste, Stärke zu verzuckern. Zehn Jahre später stellte *Bourquelot* eingehendere Versuche an; dieser Forscher erbrachte den Nachweis, daſs Diastase aus einer Kultur dieses Pilzes zur Zeit seiner vollen Fruktifikation ausgezogen werden kann.

Die quantitative Bestimmung ist schwierig, wenn nicht unmöglich, denn wie wir später sehen werden, enthält Aspergillus niger andere Enzyme, von denen eines auf den aus der Stärke gebildeten Zucker zersetzend einwirkt.

Im Jahre 1895 wiesen *Bourquelot* und *Hérissey* dieselbe Diastase in den Geweben von Polyporus sulphureus nach. Sie kommt in diesem Pilz, wie in dem Aspergillus, neben anderen Enzymen vor, kann jedoch leicht durch Auspressen des Saftes des breiten Thallus und durch Ausfällen mit der doppelten Menge Alkohol dargestellt werden. Die diastatische Kraft kann in dem nicht behandelten Saft nachgewiesen werden.

Digitized by Google

Nach *de Bary* kann Diastase aus dem Plasmodium von *Aethelium*, einem Myxomyceten dargestellt werden, nach *Stone* kommt sie im Take, einem Präparat aus Eurotium oryzae vor.

Morris und *Wells* zeigten, dafs man Diastase aus Hefezellen ausziehen kann, und viele andere Forscher, besonders *Lauder Brunton* und *Mac Fadyen* und *Wortmann* fanden, dafs sie von Bakterien ausgeschieden wird.

Hansen entdeckte die Diastase im Milchsaft von Ficuselastica, Carica papaya und Papaver somniferum. Sie kann daraus durch Alkohol gefällt werden.

Die Anwesenheit der Diastase in Stärke oder Glykogen führenden Geweben ist nicht merkwürdig, wenn man ihre Bedeutung für die Lösung dieser Kohlenhydrate ins Auge fafst. Sie kommt jedoch auch in anderen Geweben vor, in denen diese Kohlenhydrate selten oder überhaupt nicht vorhanden sind. Aus der Zuckerrübe, die als Reservestoff hauptsächlich Rohrzucker führt, stellte *Gonnermann* aus den gemahlenen keimenden Wurzeln ein Enzym dar, das Stärkekleister und Amylodextrin verzuckert. *Baranetzky* entdeckte Diastase auch in der gelben Rübe und in der Runkelrübe.

Die Sekretionsdiastase.

Diese Art Diastase steht hauptsächlich zu dem Keimprozefs in Beziehung und kann vorzüglich in den Samen der Gräser studiert werden. Wenn man die Entwickelung des Embryo in den keimenden Samen mit Hilfe des Mikroskopes verfolgt, so kann man zu einer Zeit, zu der das primäre Würzelchen eine Länge von etwa 2 mm erreicht hat, Veränderungen in den stärkeführenden Zellen des Endospermes beobachten. Die Zellwände werden zerstört, und die Stärkekörner unterliegen zu dieser Zeit einem Lösungsprozefs, der gänzlich verschieden ist von dem, der in anderen Teilen der Pflanze Platz greift.

Anstatt sich ohne Änderung ihrer Form allmählich zu lösen, bilden sich kleine Vertiefungen oder Gruben auf ihrer Oberfäche. Diese werden nach und nach tiefer und weiter, und bald zerfällt das Korn in unregelmäfsige Stücke, während auch die einzelnen Lamellen Neigung zeigen, auseinanderzufallen. Diesem Zerfressungsprozefs folgt später das allmähliche Verschwinden der einzelnen Teile des Kornes.

Digitized by Google

Die Bildung und das Verhalten der Diastase, die diese Veränderungen hervorruft, ist insbesondere von *Brown* und *Morris* und von *Haberlandt* studiert worden, die ihre Untersuchungen hauptsächlich auf verschiedene Getreidearten ausdehnten, vornehmlich auf Gerste und Roggen. Sämtliche Forscher stimmen in der Ansicht überein, dafs sie ihren Ursprung einer durch den Embryo bewirkten Sekretion verdankt, der so das Mittel findet, für seine eigene Ernährung zu sorgen, indem er in das dem Embryo benachbarte Endosperm Enzyme aussendet, unter denen sich auch die Diastase befindet.

Der Embryo liegt bei den Gräsern am einen Ende des Kornes; der Anteil, mit dem er mit dem Gewebe des Endosperms in Berührung steht, ist das sog. Skutellum, eine parenchymatisches Gewebe, dessen morphologische Natur viel umstritten war, das jedoch wahrscheinlich ein besonders differentiierter Teil des Samenlappens ist. Über der Oberfläche des Skutellums, angrenzend an die Zellen des Endospermes, befindet sich eine scharf markierte äufsere Schicht oder das Epithelium. Dieses besteht aus eng nebeneinander gelagerten säulenförmigen Zellen, die etwa dreimal so lang als breit sind und die mit ihren Längsachsen rechtwinklig zur Oberfläche angeordnet sind. Die Zellwände sind fein und dünn und bestehen aus unveränderter Cellulose. Jede Zelle enthält ein fein gekörntes Plasma und einen ziemlich grofsen Zellkern. Vor den Untersuchungen von *Brown* und *Morris* glaubte man, dieses Epithelium habe nur die Aufgabe, die Aufnahme der abgebauten Reservestoffe zu vermitteln, die vom Endosperm zum Embryo hinüber wandern. Diese Forscher haben jedoch gezeigt, dafs es auch die Stelle ist, an der sich ein, wenn nicht zwei Enzyme bilden, einmal die hier in Rede stehende Diastase und ein zweites, das die einleitende Auflösung der Zellwände bewirkt. Wenn das Gerstenkorn einige Stunden unter Keimbedingungen gehalten wird, so findet im Inhalt der Zellen eine ausgesprochene Veränderung statt. Das Protoplasma wird ersichtlich gröber in der Struktur, und die Körner wachsen an Zahl und Umfang, wobei sie in der Zelle einen solchen Raum einnehmen, dafs sie den Zellkern fast verdecken. Diese Veränderungen erreichen in 1—2 Tagen ihren Höhepunkt, von da ab verändern sich die Zellen während des Keimprozesses nicht

Digitized by Google

weiter. Das Gewebe des Endosperms über dem Skutellum wird stärkefrei, während das Epithelium grobkörnig bleibt, und die Gewebe des Embryos selbst, hauptsächlich die Zellen des Skutellums, sich mehr und mehr mit neu gebildeten Stärkekörnern anreichern. Wenn auf diese Weise das Reservestärkelager im Endosperm erschöpft ist, dann ändern die Epithelzellen wieder ihr Aussehen, indem sie die körnige Beschaffenheit verlieren und wieder durchscheinend werden wie im Anfang. Doch besteht ein wichtiger Unterschied zwischen ihrem ersten und letzten Zustand, da der Zellkern hier verschwunden ist, ein Zeichen, dafs die Zellen ihre Arbeit vollendet haben und im Begriff sind, sich aufzulösen. Der Keimprozefs zeigt also, dafs in seinem Beginn im Epithelium ein aktiver Stoffwechselprozefs vor sich geht, gleichzeitig mit der Auflösung der Zellwände und der Umwandlung der Stärke; er hält so lange an, als Stärke aufgelöst wird und hört auf, wenn dieser Prozefs beendigt ist. Der einleuchtende Schlufs, der aus diesen Beobachtungen gezogen werden kann, geht dahin, dafs diese metabolischen Veränderungen mit der Bereitung der Sekretion im Zusammenhang stehen, die das Verschwinden der Reservestoffe, Zellstoff und Stärke, bewirkt, d. h.: das Epithelium ist eigentlich eine Art Drüse.

Dafs dieser Schlufs nicht rein hypothetisch ist, haben *Brown* und *Morris* durch sorgfältig ausgeführte Untersuchungen dargethan, indem sie die von keimenden Körnern entfernten Embryonen künstlich ernährten. Diese Embryonen wurden sorgfältig losgelöst und ihre skutellare Oberfläche von anhängender Substanz sorgfältig mittelst eines in verdünnte Zuckerlösung getauchten Kameelhaarpinsels befreit. Dann wurden sie auf eine dünne Lage feuchter Gerstenstärke gelegt, so dafs ihr Schildchen mit letzteren in Berührung kam. In ganz kurzer Zeit konnten transitorische Stärkekörner im Parenchym des Schildchens entdeckt werden; wie die mikroskopische Prüfung ergab, waren die Stärkekörner, die mit der Oberfläche des Epitheliums in Berührung waren, korrodiert und in der Auflösung begriffen. Bei weiteren Versuchen wurden die losgelösten Embryonen zum Teil in eine 5prozentige Gelatinelösung eingebettet, in der kleine Mengen Gerstenstärke verteilt waren. Die Einbettung wurde vorgenommen, gerade als die Gelatinelösung im Begriff war, zu erstarren, so dafs die gekrümmte

Digitized by Google

Oberfläche jedes Schildchens in enger Berührung mit dem Kulturmedium stand. Nach einiger Zeit wurden kleine Stücke der Gelatine aus der gerade unter dem wachsenden Embryo liegenden Masse herausgeschnitten; es zeigte sich, dafs die Stärkekörner ebenso wie beim vorhergehenden Versuch korrodiert waren. Aufser Gerstenstärke korrodierte und löste die in die Gelatine übergegangene Diastase auch noch Weizen-, Reis- und Maisstärke; auf Kartoffel- und Schminkbohnenstärke schien sie jedoch ohne Wirkung zu sein.

Ein weiterer Beweis für den Zusammenhang zwischen der Ausscheidung der Diastase und den Epithelzellen wurde dadurch erbracht, dafs die letzteren durch Chloroformdämpfe gelähmt wurden: nach einer solchen Behandlung hatten sie keine Wirkung auf die Stärke.

Frisch losgelöste Embryonen von ruhender Gerste wurden dann in einem Mörser mit etwas Chloroformwasser abgerieben und 24 Stunden stehen gelassen. Der Auszug wurde alsdann filtriert, mit dem gleichen Raumteil einer 2,5 prozentigen Lösung von löslicher Stärke versetzt und bei 30 ° C. eine Stunde digeriert. Er hatte keine diastatische Wirkung. Gleichzeitig wurden Embryonen, die derselben Gerstenprobe entnommen waren, vier Tage lang auf einem geeigneten Kulturmedium kultiviert. Dann wurden sie genau so behandelt, wie die erste Probe; der Auszug hatte unter gleichen Bedingungen ein starkes Stärkeverzuckerungsvermögen. Sowohl auf mikroskopischem als auch auf chemischem Wege zeigten *Brown* und *Morris*, dafs die Diastase während der Keimung gebildet wird, dafs sie fernerhin nach erfolgter Bildung langsam aus dem Epithelium herausdiffundiert.

Diese Forscher wiesen ferner die Bildung der Diastase durch das Epithelium nach, indem sie letzteres sorgfältig vom Rest des Schildchens durch Abkratzen befreiten. Sie fanden, dafs derartig von ihren Hüllen befreite Schildchen im stande waren, lösliche Kohlenhydrate aufzunehmen, wenn sie auf letztere aufgelagert wurden, sie hatten aber ihre Fähigkeit verloren, Stärkekörner zu korrodieren. Sehr dünne Schnitte des Epitheliums, die tangential zur Oberfläche des Schildchens genommen und auf die Stärke-Gelatinemischung aufgelegt wurden, übten auf die Stärkekörner sowohl eine korrodierende, als auch eine lösende Wirkung aus.

Digitized by Google

Diese sekretorische Wirkung des Epitheliums zeigen die Körner nur im Stadium des Keimprozesses. Das Vermögen, Diastase zu bilden, scheint nur vorhanden zu sein, wenn die Gerste ganz reif ist. Gerste, frisch aus unreifen Ähren gewonnen, zeigt bereits die oben beschriebene Struktur, die Schildchen einer solchen unreifen Gerste üben jedoch auf Stärke keine Wirkung aus. Die in den ungekeimten Körnern vorhandene Diastase ist im Körper des Kornes selbst verteilt und nicht im Schildchen. Noch mehr zeigt sie durch ihr allgemeines Verhalten, dafs sie eine Translokationsdiastase ist.

Die Zunahme der Diastasesekretion während des Keimprozesses ist sehr augenfällig. Wenn man Embryonen nach viertägiger Keimung vergleicht mit anderen, drei Tage älteren, so verhält sich die diastatische Kraft in beiden Fällen wie 16 : 66. *Petit* giebt an, dafs vor dem 4. Keimungstag keine Diastase vorhanden sei.

Haberlandt sprach die Ansicht aus, dafs die Sekretions-Diastase nicht nur vom Schildchen, sondern auch von der sogenannten Aleuronschicht des Endospermes bereitet wird. Diese Schicht besteht aus drei oder vier Zellreihen, und die konstituierenden Zellen haben dicke und etwas verkorkte Wände. Sie liegt in dem peripherischen Teil des Kornes, gerade unter der Schicht, die sich zusammensetzt aus dem Perikarpium und der Schale. Der Inhalt der Zellen besteht hauptsächlich aus Aleuronkörnern mit etwas Öl, eingebettet im Protoplasma. Jede Zelle enthält einen wohlausgeprägten Zellkern. Die Aleuronschicht bedeckt das ganze Endosperm, wird aber weniger deutlich sichtbar in der Nähe des Embryo, wo sie zu einer einzigen Zelllage reduziert ist.

Haberlandt führte seine Untersuchungen mit Roggen aus; er glaubte für diesen sowohl den histologischen als auch chemischen Nachweis erbracht zu haben, dafs während der Keimung eine Diastasesekretion sowohl in diesen Zellen, als auch in denen des Schildchens stattfindet. Er fand, dafs während der Keimung die Korrosion der Stärkekörner zuerst zwischen dem Schildchen und der Aleuronschicht des Roggenkornes stattfindet und dafs beim Fortschreiten des Prozesses die diastatische Wirkung in den Zellen, die unter der Aleuronschicht liegen, früher Platz greift als in denen des zentralen Teiles des Endospermes. Die Zellen

Digitized by Google

der Aleuronschicht nehmen das eigenartige gekörnte Aussehen der secernierenden Zellen an und laufen warzenförmig in das Innere des Endosperms aus. Er entfernte Stücke der Hülle, die die Aleuronschicht umschliefst, von Roggenkörnern, die so weit gekeimt waren, dafs das verbindende Gewebe zwischen der Aleuronschicht und dem Endosperm entfernt und so erstere in enge Berührung mit der Schale und dem Perikarp gebracht war. Er wusch sie alsdann mit einer in schwaches Zuckerwasser getauchten Bürste und legt sie auf feuchtes Filtrierpapier mit der Aleuronschicht nach oben. Auf dieses Präparat wurde dann eine kleine Menge in Wasser suspendierter Stärke sorgfältig gebracht und das Ganze bei 18—20 ° C. gehalten. Eine Korrosion der Stärkekörner fand innerhalb 24 Stunden statt.

Ebenso wie die Zellen des Epitheliums des Schildchens, so zeigten auch die der Aleuronschicht erst zu Anfang der Keimung die Fähigkeit, Stärke zu korrodieren.

In ihrer im Jahre 1890 veröffentlichten Arbeit widersprachen *Brown* und *Morris* den Ansichten *Haberlandts* und sprachen der Aleuronschicht die ihr von diesem beigelegte Bedeutung ab. In einer neueren im Jahre 1897 ausgeführten Arbeit führten *Brown* und *Escombe* sehr eingehende Versuche über diesen Gegenstand aus; nachdem der Einflufs der Mikroorganismen und die mögliche Gegenwart von Translokationsdiastase in den stärkeführenden Zellen ausgeschlossen war, kamen sie zu dem Schlufs, dafs die Aleuronschicht eine sekretorische Funktion ausübt und eine gewisse Menge Diastase bildet, aus der Art jedoch, wie diese auf Stärkekörner einwirkte, schlossen sie, dafs es die Translokationsdiastase sei. Es konnte nicht beobachtet werden, dafs die Stärkekörner angefressen wurden und sich mit Gruben überzogen, was so sehr charakteristisch ist für die Schildchen-Diastase, der Prozefs war vielmehr ein regelmäfsiger Lösungsprozefs, der in einigen Fällen von einem Zerfall der Stärkekörner ohne voraufgegangene Grubenbildung begleitet war.

In der Aleuronschicht wird hauptsächlich ein anderes Enzym gebildet, die Cytase, die die Zellwände löst; dieses Enzym wird in einem späteren Kapitel ausführlicher behandelt. Wie das Schildchenepithel, secerniert die Aleuronschicht also zwei Diastasen, die Cytase und die Diastase. Beim Vergleich der beiden Bil-

Digitized by Google

dungsstätten ergiebt sich, dafs Cytase hauptsächlich in der Aleuronschicht, die Diastase mehr in der Schildchenschicht gebildet wird.

Die Ergebnisse von *Haberlandt*, *Brown* und *Morris*, sowie *Brown* und *Escombe* sind durch die Untersuchungen anderer Forscher, hauptsächlich *Grüss*, *Hansteen* und *Puriewitsch* bestätigt worden. *Grüss* ist der Ansicht, dafs die Entleerung der stärkeführenden Zellen unterhalb der Aleuronschicht zum Teil zurückzuführen ist auf die darin vorhandene rückständige Diastase.

Die Unterschiede zwischen den beiden Arten pflanzlicher Diastase sind von *Lintner* und *Eckhardt* studiert worden; diese haben zu ihren vergleichenden Versuchen die Diastasen des gekeimten und nicht gekeimten Gerstenkornes herangezogen. Bei ihren Untersuchungen stellten sie die Sekretionsdiastase aus Malzauszügen dar, deren charakteristisches Enzym sie bildet. Sie stellten aus Malz und aus Gerste Auszüge her, derart, dafs beide Lösungen ein gleich grofses stärkeumwandelndes Vermögen besafsen und demnach in ihren anderen Eigenschaften vergleichbar waren. Bei der Einwirkung dieser Auszüge auf lösliche Stärke bei verschiedenen Temperaturen konnten sie für jede eine Kurve konstruieren, die zeigte, in wie verschiedener Weise die Temperatur ihr Verhalten beeinflufste. Die Kurven wurden in der Weise konstruiert, dafs die Abcissen durch die Temperaturen dargestellt wurden und die Ordinaten proportional waren dem Kupferreduktionsvermögen, das die Lösung am Ende des Versuches aufwies. Die beiden Kurven unterschieden sich wesentlich. Die Malzdiastase wies ein Optimum auf, d. h. einen Punkt der gröfsten Wirksamkeit, bei 50—55° C., die Gerstendiastase, die Translokationsdiastase, war am wirksamsten bei 45—50° C., durchschnittlich etwa 5° C. niedriger. Bei 35° C. waren sie gleich wirksam; bei 4° C. hatte die Gerstendiastase so viel diastatische Kraft als die Malzdiastase bei 14,5° C.

Kjeldahl hat ebenfalls einige vergleichende Untersuchungen über die beiden Diastasen veröffentlicht. Er bestätigt *Lintner's* Ergebnisse in Bezug auf die günstigste Wirkung der Sekretionsdiastase, verlegt jedoch die Temperatur, bei der sie durch Wärme gestört wird, etwas höher.

Zwischen den beiden Pflanzendiastasen kann man folgende Parallelen ziehen:

Digitized by Google

1. Translokationsdiastase: Sie löst Stärkekörner ohne Korrosion, hat eine sehr langsame Einwirkung auf Stärkekleister, obwohl sie lösliche Stärke leicht in Zucker überführt; sie wirkt am besten bei einer Temperatur von 45—50° C. und ist bei niederer Temperatur wirksamer als die Sekretions-Diastase.

2. Sekretionsdiastase: Sie korrodiert Stärkekörner und zerbröckelt sie vor der Lösung; sie verflüssigt Stärkekleister rasch; wirkt am besten bei einer Temperatur von 50—55° C. und widersteht, ohne abgetötet zu werden, einer Temperatur von 70° C.

Diastase wird sowohl von einigen der niedersten Pflanzen, als auch von den höher organisierten ausgeschieden. Bei den letzteren ist die Gegenwart der ersten Varietät verknüpft mit der Umwandlung der Stärke zwecks Überführung derselben aus einer Zelle in die andere, wobei das Enzym stets innerhalb der Zellen bleibt. Die Sekretionsdiastase hinwiederum wird gebildet von einem besonderen Drüsenorgan und wird von diesem dahin abgeschieden, wo es im stande ist, Nährstoffe zu bereiten, die nachher von den Zellen absorbiert werden, die an erster Stelle das Enzym erzeugten. Der Gerstenkeimling löst und absorbiert in der That das Endosperm, auf dem er parasitisch wächst.

Auch bei den niederen Pflanzen können wir ein ähnliches Verhalten beobachten. Das Vorkommen von Diastase in mehreren Bakterien ist festgestellt; aus einigen derselben kann man sie extrahieren. Diese Organismen enthalten sie nicht gleichmäfsig, auch findet sie sich nicht zu allen Zeiten in den Organismen, die sie ausscheiden.

Lauder Bruton und *Mac Fadyen* isolierten sie aus *Klein's* Schorfbacillus und aus dem Welford-Bacillus, jedoch secernierten sie diese Organismen nur, wenn sie auf Stärkekleister gezüchtet wurden. Bei der Benutzung von Fleischextrakt als Nährmedium, wurde keine Diastase gebildet. *Wortmann* zeigte im Jahre 1882, dafs gewisse Bakterien diastatische Wirksamkeit gegen Stärke zeigen, indem sie ein Enzym secernieren, wenn Stärkekörner die einzige ihnen zugängliche Nahrung ausmachen.

Im Bacillus mesentericus vulgatus hat man Diastase neben vier anderen Enzymen gefunden. Der Cholerabacillus von *Koch* kann bei der Kultur auf Stärkekleister diesen verflüssigen und

Digitized by Google

einen Teil der Stärke in Zucker umwandeln. Er vermag dies augenscheinlich durch die Wirkung seines eignen Plasmas, wenigstens behauptet *Wood*, der die Erscheinung beobachtete, dafs kein Enzym ausgeschieden wird oder auf irgend eine Weise aus den Zellen ausgezogen werden kann. Beim Vergleich dieser Thatsachen mit den bereits erörterten erscheint es wahrscheinlich, dafs seine Extraktionsmethoden mangelhafte waren, da es schwer einzusehen ist, wie das Protoplasma des Bacillus und der Stärkekleister mit einander in Berührung kommen konnten, da dem die den Organismus einschliefsende Zellhaut hinderlich im Wege steht. Protoplasma besitzt zweifelsohne ein Stärkeumwandlungsvermögen, es mufs jedoch mit der Stärke in Berührung kommen, um es ausüben zu können. Diese Eigenschaft des Protoplasmas wird in einem späteren Kapitel eingehender betrachtet werden.

Pfeffer konnte die Ausscheidung der Diastase durch das Bacterium megatherium bestimmen; er fand, dafs die Menge des von diesem Organismus gebildeten Enzyms in der Hauptsache abhängt von der Menge des im Kulturmedium vorhandenen Rohrzuckers. Er dehnte seine Untersuchungen in dieser Richtung auf mehrere Schimmelpilze aus und fand diesen Einflufs der Beschaffenheit des Kulturmediums bestätigt. Penicillium glaucum hörte auf, Diastase zu bilden bei Gegenwart von 10% Rohrzucker, und selbst bei Gegenwart von nur 1,5% wurde die Stärke nur wenig angegriffen. Aspergillus niger verhielt sich anders, indem er selbst bei 30% Rohrzucker noch Diastase bildete. Durch verschiedene Zuckerarten wird die Sekretion der Enzyme in verschiedener Weise beeinflufst, Rohrzucker und Dextrose sind in dieser Beziehung wirksamer als Maltose. Da die beiden erstgenannten Zuckerarten für die Ernährung der Organismen die gröfste Bedeutung haben, so scheint dieses Ergebnis darauf hinzuweisen, dafs die Bildung von Diastase in diesen Pflanzen nur unter dem Drucke eines Halbhungers vor sich geht. Dies wird noch wahrscheinlicher dadurch, dafs bei einer Unterstützung des Wachstums dieser Pflanzen durch Pepton, eine gröfsere Menge Zucker zur Unterdrückung der Diastasebildung nötig ist.

Digitized by Google

Bemerkungen zu vorstehendem Kapitel.

Die Ansicht, dafs der Embryo Diastase ausscheidet, wurde von *H. Linx* bestritten, welcher meinte, dafs die Verzuckerung des dem Embryo gebotenen Substrates von Bakterien herrühre.

(Vergl. *H. Linx*, Beiträge zur Physiologie der Keimung des Mais. Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. 1896.)

Demgegenüber konnte *Grüfs* endgültig feststellen, dafs der wachsende Embryo ohne Gegenwart von Bakterien Stärkekleister zu verzuckern vermag, also Diastase ausscheidet.

(Vergl. *J. Grüfs*, Über die Sekretion des Schildchens. Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. 1897.)

Windisch.

Digitized by Google

Kapitel III.

Tierische Diastase.

Das Vorkommen eines diastatischen Prinzipes in tierischen Zellen wurde zuerst von *Leuchs* im Jahre 1831 festgestellt, der die Entdeckung machte, dafs Speichel das Vermögen besitzt, Stärke in Zucker überzuführen. Er beachtete die Thatsache nicht weiter, und erst im Jahre 1845 wurde das Enzym aus der Sekretion der Speicheldrüse von *Mialhe* durch Fällung des Speichels mit absolutem Alkohol dargestellt. In reinerer Form wurde es 1863 von *Cohnheim* dargestellt nach einer Methode, die später beschrieben werden soll.

Im Jahre 1845 stellten *Bouchardat* und *Sandras* dasselbe Enzym aus dem Pankreassaft dar.

Weitere Beobachtungen, die hauptsächlich im laufenden Jahrzehnt gemacht wurden, zeigten, dafs die Diastase im Tierkörper ebenso verbreitet ist wie im Pflanzenkörper. Wenn auch nicht so flagrant wie bei den Pflanzen zwei Arten Diastase nachgewiesen wurden, so kennt man doch zwei Arten der Wirksamkeit, die sehr denen der Translokations- und Sekretionsdiastasen im Pflanzenkörper entsprechen. So ergiefsen sich die Sekretionen der Speicheldrüse und des Pankreas in gewisse Teile des Verdauungskanals, zu dem Zweck, die Stärke und das Glykogen der tierischen Nahrung in diffusibele Formen überzuführen, während in den Geweben, die letzteres Kohlenhydrat enthalten, ein Enzym gebildet wird, die nur auf das Glykogen innerhalb der Zelle einwirkt; aus letzteren werden die diffusiblen Produkte durch eine Art Translokation weggeführt.

Röhmann fand die Diastase in kleinen Mengen in dem Dünndarmsaft, in bedeutend kleinerer Menge als im Speichel oder Pankreassaft.

Digitized by Google

Hamburger machte eine ähnliche Beobachtung. Bei der vergleichenden Bestimmung der diastatischen Kraft des Speichels, des Pankreassaftes und der Dünndarmsekretion durch Bestimmung des gebildeten Zuckers mittelst der Kupfermethode fand er, daſs diese sich, das Reduktionsvermögen der Glukose als Vergleichseinheit gesetzt, verhalten wie 0,31 zu 0,36 zu 0,26. Diese Menge Zucker wurde vom Speichel und vom Pankreas-Saft in einer Stunde oder weniger gebildet, während der Dünndarmsaft hierzu mehr als einen Tag brauchte. Der Dünndarmsaft enthält daher nur sehr wenig Diastase.

Die Anwesenheit des Enzyms im Darmsaft der Schafe wurde von *Pregl* im Jahre 1895 nachgewiesen.

Die andere Varietät, die wenigstens in ihrer Wirkung der Translokationdiastase entspricht, findet sich fast in allen Geweben und Flüssigkeiten des Körpers, obwohl sie oft nur in sehr kleinen Mengen vorhanden ist und sehr schwierig zu extrahieren ist. Die verschiedenen Tiere zeigen jedoch beträchtliche Unterschiede in dieser Beziehung.

Die Leber und die Muskeln sind die hauptsächlichsten Speicher für die Kohlenhydrat-Reservestoffe im Körper, wo sie in der Form von groſsen Mengen Glykogen abgelagert sind, die von Zeit zu Zeit beträchtlich wechseln. Wenn das Kohlenhydrat die Leber verläſst, so geschieht dies in der Form von Zucker, hauptsächlich Glukose; die Umwandlung des Glykogens in letztere muſs daher in diesem Organ vor sich gehen. Über die Möglichkeit einer Bildung eines löslichen Enzyms in den Leberzellen sind sehr widersprechende Angaben gemacht worden.

Wir verlassen diese Frage für den Augenblick und wenden uns anderen Körpersäften zu, bei denen es weniger wahrscheinlich ist, daſs sie diastatische Enzyme enthalten wie der Speichel, Pankreas- und Dünndarmsaft; doch ist deren Anwesenheit im Blut und in der Lymphe sehr wahrscheinlich. *Bial* konstatierte im Jahre 1893, daſs Diastase aus dem Serum dieser beiden Säfte gewonnen werden kann, jedoch nicht aus deren Körperchen. *Röhmann* machte um dieselbe Zeit die Beobachtung, daſs, wenn Glykogen in die Lymphgefäſse eines Tieres eingespritzt und die Lymphe aus dem Brustlymphgefäſs in Alkohol abgelassen wird, der Zuckergehalt der Lymphe gestiegen ist. Das Glykogen spritzte

Digitized by Google

er bei seinen Versuchen in einer kleinen Menge etwa 0,6prozentiger Kochsalzlösung verteilt ein. Die Salzlösung allein brachte keine Wirkung hervor.

Röhmann fand auch die Diastase im Blut neben anderen Enzymen, jedoch nur in verhältnismäfsig kleiner Menge. *Dastre* fand auch Diastase in der Lymphe, die nach seinen Angaben etwa 0,097 $^0/_{00}$ Glykogen enthält. Wird die Lymphe nach 24stündigem Stehen untersucht, so ist das Glykogen verschwunden. In der bereits angeführten Arbeit von *Hamburger* wird ebenfalls die Anwesenheit eines zuckerbildenden Enzyms im Blute behauptet. Er giebt an, dafs es sehr langsam einen Zucker bildet, der ein gröfseres Kupferreduktionsvermögen besitzt, als der vom Speichel gebildete Zucker. Er führt aus, dafs dieser Zucker wahrscheinlich nicht das Produkt der Wirkung der Diastase allein ist, sondern dafs der von letzterer gebildete Zucker von einem anderen ebenfalls im Blut vorhandenen Enzym weiter verändert wird. Er führt jedoch den Nachweis, dafs das Blut die Fähigkeit besitzt, Stärke in Zucker überzuführen, eine Fähigkeit, die nur der Diastase zukommt.

Foster fand, dafs der Herzbeutel-, Brustfell- und Bauchfellsaft die Fähigkeit besitzt, Stärke in Zucker zu verwandeln, und *Grohe* behauptet, dafs es sich mit dem Milchsaft ebenso verhält. Nach *Cohnheim* und *Béchamp* besitzt frisch filtrierter Urin dieselbe Fähigkeit, er soll so viel Enzym enthalten, dafs man es durch Fällung mit Alkohol erhalten kann. Seine Gegenwart im Urin deutet wahrscheinlich darauf hin, dafs es vom Blut ausgeschieden wird, da die Menge gröfser ist nach den Mahlzeiten. *Foster* giebt an, dafs es aus den natürlichen Uratsedimenten dargestellt werden kann, mit oder ohne vorheriges Auswaschen mit Alhohol.

Die im Speichelpankreas und Dünndarm vorhandene Diastase ist wie die der keimenden Gerste eine Ausscheidung eines bestimmten Gewebes. Der Speichel der Säugetiere wird in gewissen Gebilden erzeugt, die man unter dem Namen Speicheldrüsen kennt. Drei Paare solcher Drüsen besitzt der Körper, die Ohrdrüsen zu beiden Seiten des Gesichtes, die Kinnladen-Drüsen (submaxillaren Drüsen) gerade unter dem Unterkiefer gelegen, und die sublingualen Drüsen, die am Grund des Mundes zwischen der Zunge und dem Zahnfleisch des Unterkiefers liegen. Jede besteht aus

Digitized by Google

einer Anzahl Röhren, die in Gänge münden, welche ihrerseits sich zu einem einzigen grofsen Ausgang vereinigen, durch den die ganze Sekretion der Drüse ausfliefst. Die Röhren sind vielfach verschlungen und mit einander durch Bindegewebe zu Läppchen verbunden, so dafs die ganze Drüse eine feste Masse von geringem Umfange bildet. Die Sekretion findet in den hintersten Röhren oder den Drüsenalveolen statt. Jede von diesen besteht aus einem durchsichtigen Grundgewebe; auf dessen innerer Seite sind die secernierenden Zellen angeordnet. Im Centrum befindet sich ein sehr kleines Lumen, das von den freien Zellwänden gebildet wird. Jede Zelle wird von der Lymphe gebadet, die aus einem engen Geflecht von Blutröhrchen fliefst, die in dem Bindegewebe an der Aufsenseite des Grundgewebes liegen und die das Ganze zusammenhalten helfen. Die Zellen erhalten so an ihrer Basis eine Zufuhr von Lymphe, während der ausgeschiedene Speichel von ihnen in den schmalen Kanal entleert wird, der das Centrum der Alveolen bildet. Jede Drüse ist mit einer doppelten Reihe von Nervenfasern versehen, die eine vom cerebro-spinalen, die andere vom sympathischen System ausgehend.

Die Struktur der secernierenden Zellen unterscheidet sich in einem wichtigen Punkt von der der Zellen des Schildchenepithels im Gerstenkorn. Sie werden nämlich nicht von einer Cellulose-Membran bekleidet, und ihr Protoplasma wird daher fortwährend von der Lymphe bespült, mit der sie in freier Berührung stehen. Sie bestehen aus Protoplasma, welches, wie man sehen kann, in einem Netzwerk angeordnet ist; in einigen Zellen ist dies ziemlich regelmäfsig und eng, während in anderen die Gröfse seiner Maschen wechselt. Die äufsere oder Grenzlage der Zelle hat viel engere Maschen als die andere und stellt fast eine ununterbrochene Schicht dar. Zwischen den Zellen des Protoplasmas ist eine mehr durchscheinende, ziemlich flüssige Materie, die man oft als Paraplasma bezeichnet. Dieses enthält verschiedene Substanzen und ist angefüllt mit einer körnigen Masse. Auch findet sich stets ein durchsichtiger Zellkern vor, seine Lage wechselt jedoch in den Zellen der verschiedenen Drüsen.

Der Prozefs der Bildung der Diastase oder des Ptyalins, wie sie oft genannt wird, kann mikroskopisch unter verschiedenen Bedingungen, unter denen das Tier gehalten wird, verfolgt werden.

Digitized by Google

Wenn man nach einer Fastperiode prüft, so sind die Maschen des Protoplasmas mit Körnchen derart angefüllt, dafs die Umrisse der Zellen kaum, wenn überhaupt, sichtbar sind und der Zellkern gänzlich verdunkelt ist. Wenn die Drüse unmittelbar nach einem starken Speichelausflufs entnommen wird, dann sind die Körnchen kleiner und vereinzelter und an den Seiten der Zellen in der Nähe des Lumens angehäuft, wobei der äufsere Rand klar erscheint. Die ganze Zelle ist etwas kleiner, gleichsam geschrumpft, und der Zellkern ist deutlich sichtbar. Die Prüfung kann mit dem frischen Gewebe vorgenommen werden, oder auch noch leichter nach dessen Behandlung mit Osmiumsäure, die die Körnchen schwarz färbt.

Der Sekretionsprozefs scheint in drei Phasen zu verlaufen: Aufnahme der Nahrung von der Lymphe durch die Zelle, die Bildung und Ablegung der Körnchen in ihrem Innern und die darauffolgende Lösung und gleichzeitige Ausstofsung derselben von der Zelle in den Kanal. Alle diese Prozesse verlaufen unter der Kontrolle der Nerven, mit denen die Drüsen versehen sind, von denen jede eine bestimmte Aufgabe hat. Bei der submaxillaren Drüse scheint die Bildung und Lösung der Körnchen von einem Ast der sympathischen Nerven reguliert zu werden und ihre Ausstofsung aus den Zellen durch die Chorda tympani, einem Ast des siebenten Schädelnerven, bewirkt zu werden.

Die Natur der Körnchen ist noch nicht genau erforscht. Sie sind wahrscheinlich nicht die Diastase selbst, aber ein unmittelbarer Vorgänger derselben; aus ihnen bildet sich Diastase, wenn sie sich lösen und die Zelle verlassen. Diese Ansicht gründet sich jedoch mehr auf die Analogie mit den Vorgängen in anderen Drüsen als auf direkte Beobachtungen der Speicheldrüsen.

In einigen der Speichelzellen sind die Körnchen sicherlich nicht alle Diastase, da die Sekretion der Drüse auch noch andere Körper aufweist, hauptsächlich Mucin. Auch scheint die Körnung zu der aus einer Drüse erhältlichen Diastase in keinem Verhältnis zu stehen.

Das körnige Aussehen der tierischen Zelle erinnert daran, dafs eine ähnliche Körnung im Schildchenepithel des Gerstenkornes während der Diastasebildung beobachtet werden kann.

Ähnliche Erscheinungen, wie die für die Speicheldrüse be-

Digitized by Google

schriebenen, können in den Zellen des Pankreas beobachtet werden, der eine ganz ähnliche Struktur hat. Die Zellen dieses Organes secernieren jedoch aufser Diastase noch andere Enzyme, die später besprochen werden. Von den Körnchen dieser Zellen weifs man, dafs sie nicht aus den Enzymen selbst bestehen, sondern aus Vorläufern derselben, die man Zymogene genannt hat. Möglicherweise unterscheiden sich die Körnchen noch untereinander, indem einige diesem, andere jenem Zymogen angehören.

Der Gehalt des Speichels und Paskreassaftes an Diastase schwankt je nach dem Tier, dem diese Sekrete entnommen sind. Am geringsten ist er in den Säften der Pflanzenfresser; der Speichel des Pferdes ist so gut wie frei davon. Auch in den Ausscheidungen der jungen Tiere ist, solange sie gesäugt werden, nur sehr wenig Diastase.

Die Diastase des Blutes und der Lymphe kann verglichen werden mit der Translokationsdiastase der Pflanzen. Sie wirkt auf Substanzen dieser Flüssigkeiten und kommt mit den Kohlenhydraten des Verdauungskanales nicht in Berührung. Ihre Entstehungsweise ist unbekannt; das Mikroskop läfst uns bei der Erforschung dieser Frage im Stich.

Die Frage der Aufspeicherung der Reserve-Kohlenhydrate im Körper und der Möglichkeit ihrer Translokation (Weiterbeförderung) durch Diastase ist nicht so klar gelöst, wie die der Ausscheidungen der Drüsen. Das hauptsächlichste Organ für die Umwandlung solcher Reserve-Kohlenhydrate ist die Leber, in der leicht grofse Mengen von Glykogen gefunden werden können, die von Zeit zu Zeit beträchtlich wechseln. Das Glykogen scheint im tierischen Organismus die Stelle der Stärke im Pflanzenorganismus zu vertreten, da es die Form ist, in der die reichlich aus dem Verdauungsorgan kommenden Kohlenhydrate aufgespeichert werden, bis sie zur Ernährung gebraucht werden.

Es ist seit der Zeit *Claude Bernard's* bekannt, dafs das aus der Leber kommende Blut eine beträchtliche Menge Zucker enthält und dafs es während einer Fastenperiode mehr davon enthält als das Blut der Pfortader, die jenem Organ die Verdauungsprodukte zuführt. Wenn man die Leber dem tierischen Organismus entnimmt, so sind die postmortalen Veränderungen (nach dem Tode), die sich in ihr abspielen, stets von Zuckerbildung be-

Digitized by Google

gleitet und da gleichzeitig das Glykogen allmählich verschwindet, so beweist dies, dafs letzteres die Quelle des Zuckers ist.

Die Frage des Vorkommens eines diastatischen Enzyms in den Leberzellen hat zu vielen Widersprüchen Anlafs gegeben. Die meisten älteren Forscher konnten einen derartigen Körper nicht auffinden; sie nahmen daher an, dafs die Umwandlungen vom Protoplasma der Zellen selbst bewirkt würden, sowohl bei Lebzeiten, als auch nach dem Tode.

Man darf hierbei jedoch nicht aufser acht lassen, dafs es in vielen Fällen sehr schwer ist, die Enzyme aus dem Protoplasma der Zellen durch blofses Einteigen in Wasser oder andere Extraktionsflüssigkeiten auszulaugen. Sehr oft hat man sich davon überzeugen können, dafs das Enzym von der Plasmasubstanz mit grofser Hartnäckigkeit festgehalten wird. Dies erscheint sehr einleuchtend, wenn man die Resultate *Wortmann's* in betreff der Laubblätter mit denen von *Brown* und *Morris* vergleicht, auf die schon hingewiesen wurde. Auch die neueren Untersuchungen von *Buchner* bestätigen diese Schwierigkeiten; dieser Forscher gewann ein alkoholbildendes Enzym aus der Hefezelle durch Anwendung hohen Druckes. Hiervon wird in einem späteren Kapitel die Rede sein; jedenfalls ist die Schwierigkeit, ein Enzym zu extrahieren, kein genügender Beweis für die Nichtanwesenheit eines Enzyms.

Von den früheren Forschern, die die Lebensvorgänge in der Leber studierten, behaupten *von Wittich* und *Claude Bernard*, dafs sie aus den Leberzellen ein Enzym extrahiert haben. *Tiegel* dagegen gelang dieses nicht, und *Seegen* und *Kratschmer* behaupteten nach vielen Versuchen, dafs es unmöglich sei, den Nachweis des Enzyms zweifellos zu führen.

Ausgedehnte Versuchsreihen stellte Fräulein *Eves* im Jahre 1882 an. Diese Forscherin trocknete die Leber verschiedener Tiere bei niedriger Temperatur und pulverisierte sie alsdann in einem Mörser. Das Pulver wurde dann mit Salzlösung extrahiert und die Flüssigkeit filtriert. Die so bereiteten Auszüge besafsen die Fähigkeit Stärke zu verzuckern, jedoch war ihre diastatische Kraft klein im Vergleich zu der des Speichels, und zwar so klein, dafs sie zu dem Schlufs kam, dafs sicherlich die postmortale Bildung des Zuckers und das Verschwinden des Glykogens nicht einem Enzym in den Zellen zuzuschreiben sei. Sie schrieb

Digitized by Google

die ganze diastatische Kraft ihrer Auszüge dem Blut zu, das in der Leber zurückgeblieben war.

Im letzten Jahrzehnt ist die vorliegende Frage von vielen Forschern studiert worden. Die Meinung ist jetzt vorherrschend, dafs eine Diastase in der Leber vorkommt, wenn auch noch keine Übereinstimmung herrscht in den Ansichten über die Rolle, die sie in dem Metabolismus (Lebensvorgängen) dieses Organes spielt. Im Jahre 1890 veröffentlichte *Kaufmann* die Ergebnisse einiger Untersuchungen, die er über die Galle einiger Tiere anstellte. Er giebt an, dafs die Galle des Schweines, des Schafes und des Ochsen stark diastasehaltig ist, dafs dagegen kein Enzym in der Galle des Hundes entdeckt werden konnte, während die der Katze eine verhältnismäfsig kleine Menge enthalte. *Kaufmann* schliefst aus diesen Ergebnissen, dafs die Leberzellen normalerweise Diastase bilden.

Sehr erschöpfende Versuche über diesen Gegenstand sind von *Pavy* ausgeführt worden. Er entnahm die Leber von Kaninchen unmittelbar nach der Tötung, zerquetschte und zerkleinerte sie darauf in einem Mörser. Der Fleischbrei wurde mit einem Überschufs von absolutem Alkohol vermischt und hiermit sechs Monate lang stehen gelassen, wodurch die Proteide des Gewebes vollkommen koaguliert wurden. Darauf wurde der Alkohol abgegossen und die Leber mit frischem Alkohol und dann mit Äther gewaschen. Dann wurde sie getrocknet, gepulvert und durch ein feines Sieb gesiebt. Zwei Gramm Leberpulver wurden in kochendes Wasser geworfen, während weitere zwei Gramm 4 Stunden bei 46° in 20 ccm 1prozentiger Kochsalzlösung eingeteigt wurden. Beide Flüssigkeiten wurden alsdann mit *Fehling*scher Lösung titriert. Die gekochte Lösung enthielt 0,46 % reduzierenden Zucker, die Kochsalzlösung 4,27 %. Da die ursprüngliche Leber sowohl Zucker als auch Glykogen enthielt, so ergiebt der Unterschied in den beiden Zuckerzahlen die unter dem Einflufs der Leberdiastase aus dem Glykogen gebildete Zuckermenge.

Pavy hat ferner gezeigt, dafs die Leberdiastase in vollkommen trockenem Zustande ein andauerndes Erwärmen auf 80° C. übersteht. Er erhitzte etwas von dem in absolutem Alkohol suspendierten Leberpulver in kochendem Wasser 5 Minuten lang und trocknete dann wieder. Mit diesem Leberpulver und einer zweiten Probe, die für sich mit Wasser gekocht war, wurden die vorbe-

Digitized by Google

schriebenen Versuche ausgeführt, die zu dem gleichen Ergebnis führten, wie diese. Hieraus geht hervor, dafs die Reduktion bei der mit Wasser aufgekochten Flüssigkeit beim ersten Versuch auf den Zucker zurückzuführen ist, der beim Tode in der Leberzelle vorhanden ist; beim zweiten Versuch war der Zucker von dem Alkohol, mit dem das Pulver erhitzt worden war, gelöst worden. Heifser Alkohol zieht den Zucker viel leichter aus den Geweben heraus als kalter, da der Zucker von diesen mit Hartnäckigkeit festgehalten wird.

Fräulein *Tebb* hat auch mit Erfolg einen diastatischen Auszug aus der Leber bereitet. Sie trocknete Schweinsleber bei 35—40° C., zerschnitt sie fein und entfernte den Zucker daraus durch Dialyse. Dann wurde die Lebersubstanz getrocknet und gepulvert. Das Pulver verzuckerte sowohl Stärke als auch Glykogen. Mittelst 5prozentiger Lösung von schwefelsaurem Natron wurde das getrocknete Pulver dann extrahiert und die Lösung dialysiert, bis sie frei war von Zucker. Dann wurde sie mit einer 4prozentigen Lösung von Glykogen 21 Stunden lang bei 37° C. digeriert; zu diesem Zeitpunkt wurde mittelst der Phenylhydrazinprobe Zucker in gewisser Menge nachgewiesen.

Bial ist der Ansicht, dafs sowohl zu Lebzeiten, als auch nach dem Tode die Umwandlung des Glykogens in Zucker auf ein Enzym zurükzuführen ist. Er fand, dafs der Prozefs durch eine einprozentige Lösung von Fluornatrium nicht verhindert wird, und er schliefst daraus auf die Wirkung der Diastase, da dieses Salz die Lebensthätigkeit der Zelle zerstört. Er entscheidet nicht, ob die Leberzelle dieses Enzym ausscheidet, oder ob es aus dem Blute oder der Lymphe stammt, die die Leberzellen bespülen. Er sagt, dafs der gebildete Zucker Dextrose sei, und auf Grund dieser Thatsache behauptet er, dafs die gebildete Diastase dieselbe sei, wie sie im Blut und in der Lymphe vorkommt. Man hat jedoch auch Grund zur Annahme, dafs die Leberdiastase nicht verschieden sei von der des Speichels, sondern dafs noch andere Enzyme zugegen sind, die Maltose in Dextrose überführen.

Salkowski, der die Frage unabhängig von *Bial* erforschte, kommt mit diesem Forscher zu demselben Ergebnis.

Schwiening hat ebenfalls Versuche über die postmortalen Veränderungen in der Leber angestellt, besonders über den Ein-

Digitized by Google

flufs des. Chloroforms auf dieselben. Wie bereits erwähnt, tötet dieses Reagens das Protoplasma, stört jedoch die Wirkung der Diastase nicht. Er extrahierte Leber mit Chloroformwasser, die Hälfte des Auszugs kochte er zur Kontrolle. In beiden Präparaten waren Leberzellen vorhanden; in einem waren sie durch das Chloroform getötet, wobei jedoch die Diastase nicht angegriffen wurde; im andern Falle waren nicht nur die Zellen getötet, sondern auch die Diastase war zerstört durch die Kochtemperatur. Beide enthielten das ursprünglich in dem Gewebe vorhandene Glykogen. Nach einer gewissen Zeit fand man, dafs der ungekochte Auszug kein Glykogen mehr enthielt, dagegen eine beträchtliche Menge Zucker, während der gekochte Glykogen enthielt mit nur Spuren von Zucker. Er schlofs hieraus, dafs die Wirkung auf ein Enzym zurückzuführen sei, da die direkte Wirkung des Plasmas bei seinen Versuchen ausgeschlossen war. Die Spuren Zucker, die in dem gekochten Auszuge gefunden wurden, entstammten der Leber, die sie bereits zur Zeit der Entnahme enthielt.

Schwiening giebt weiter an, dafs in dem gekochten Auszug eine Umwandlung des Glykogens in Zucker bei längerer Versuchsdauer zu konstatieren sei; ihm deutet dies auf eine fortgesetzte Bildung von Diastase nach dem Tode. Dies ist jedoch nicht recht zu verstehen, da durch das Kochen nicht nur die Leberzellen getötet wurden, sondern auch die Muttersubstanz der Diastase ebenso zerstört wurde, wie die Diastase selbst.

Die Leber ist jedoch nicht das einzige Magazin für aufgespeicherte Reservekohlenhydrate, denn die Muskeln enthalten auch beträchtliche Mengen Glykogen. *Nasse* hat auch gezeigt, dafs diese Organe ein amylolytisches oder diastatisches Enzym enthalten, das durch Auspressen gewonnen werden kann. *Halliburton* bestätigte *Nasse's* Beobachtung. Er fand, dafs ein wässriger Auszug des Niederschlages, der erhalten wird beim Fällen des Muskelauszuges mit Alkohol, sowohl Stärke als auch Glykogen in reduzierenden Zucker überführt, wobei ein Zwischenprodukt von dem Charakter des Dextrins gebildet wird. Die Einwirkung auf Stärke ist sehr langsam; erst nach Ablauf von 5—6 Stunden findet eine bemerkenswerte Zuckerbildung statt.

Unter den wirbellosen Tieren kommt die Diastase ziemlich

Digitized by Google

allgemein vor; sie kann selbst in einzelligen Organismen nachgewiesen werden, in denen sie neben anderen Enzymen in dem gemeinsamen Protoplasma vorkommt.

Fredericq hat aus verschiedenen Schwämmen einen Saft ausgezogen, der auf Stärke, Fette und Eiweifsstoffe wirkte. Einen ähnlichen Auszug erhielt er aus verschiedenen Strahltieren (Echinodermata), der die gleichen Eigenschaften hatte, nur etwas langsam in seiner Wirkung war. Bei Uraster fand sich dieses Sekret im Magenmund, der sich in jedem Strahl des Tieres befindet. Ein Auszug aus diesem im vorderen Teil des Körpers liegenden Stück des Verdauungskanals von Lambricus, bis an das sechste Segment, verwandelt Stärke in Zucker. Seine Eingeweide sind gleichsam von einem Drüsengewebe umgeben, das die gleichen Eigenschaften aufweist, jedoch Stärke nur in neutralen Lösungen verzuckert. Andere Würmer bilden in ähnlichen Teilen ebenfalls Diastase. Bei den Rotiferen liegen im vorderen Teil des Magens zwei grofse Drüsenröhren, die ein Sekret liefern, das auf Stärke und Eiweifsstoffe wirkt.

Bei den höheren wirbellosen Tieren findet man ganz allgemein sowohl diastatische als proteolytische Enzyme als Produkt derselben Drüse gerade wie im Pankreas der Wirbeltiere. Die sogenannte Leber der Krustaceen und Mollusken ist offenbar ein Leberpankreas, aus dem beide Enzyme dargestellt werden können.

Die Drüsen, die im andern Teil des Verdauungskanales vieler niederen Formen liegen, sind nur diastatischer Natur. Unter den Insekten ist *Blatta* dafür bekannt, dafs sie wohlcharakterisierte Speicheldrüsen hat, die eine alkalische Flüssigkeit ausscheiden, die mit Leichtigkeit Stärke in Zucker überführt. Das Enzym kann erhalten werden durch Fällung einer Infusion der Drüsen mittelst Phosphorsäure und Kalkwasser, wobei es mit dem phosphorsauren Kalk zu Boden gerissen wird. Das Gemisch giebt beim Waschen mit destilliertem Wasser das Enzym an dieses ab und kann in ziemlich reinem Zustand aus der Lösung durch einen grofsen Überschufs von Alkohol abgeschieden werden.

Bei den Schmetterlingen finden sich Speicheldrüsen bei den vollkommen ausgebildeten geflügelten Individuen mancher Arten;

Digitized by Google

sie besitzen auch Drüsenlappen im Magen, dessen Saft sich ähnlich verhält wie der Pankreassaft der Wirbeltiere.

Die Spinnen sind in ähnlicher Weise mit Speichel- und Pankreasdrüsen versehen.

Es ist bereits gesagt worden, dafs die Leber der Molusken pankreatische Eigenschaften besitzt. Die Helix aspera hat wirkliche Speicheldrüsen, die sich in den Mund ergiefsen. Bei Helix pomatia verschwindet die diastatische Eigenschaft aus dem Pankreas-Organ während des Winterschlafes. Bei den Tintenschnecken ist die Ausscheidung der Speicheldrüsen nur diastatischer Natur, während die »Leber«, aufser dafs sie Stärke verzuckert, noch Fette emulgiert und verseift, die Milch durchsichtig macht und proteolytisch auf Eiweifs einwirkt. Von den Muscheln behauptet man, dafs sie keine besonderen Speicheldrüsen besitzen. Diastase soll in dem Mantel der Auster vorkommen, solange sie unverletzt ist, sich besonders in verschiedenen Zellen befinden, die Glykogen enthalten.

Abelous und *Heim* wiesen die Diastase in den Eiern verschiedener Krustentiere nach, unter denen erwähnt werden mögen *Maia squinado, Platycarcinus pagurus, Porlunus puber und Galathaea strigosa.* Sie konnten sie sowohl aus frischen Eiern darstellen, als auch aus solchen, die einige Zeit in 95prozentigem Alkohol aufbewahrt worden waren, wobei als Lösungsmittel Wasser oder Glycerin benutzt wurde. Sie fanden, dafs die Diastase sehr energisch bei einer Temperatur von 35° C. und in einem Medium, welches 0,1% Salzsäure enthielt, wirkte.

Zweifellos ist die im tierischen Organismus vorkommende Diastase identisch mit der pflanzlichen Diastase. *Brown* und *Heron* haben gezeigt, dafs der Verzuckerungsprozefs der pankreatischen und Malzdiastase in derselben Weise verläuft, dafs sie unter gleichen Bedingungen arbeiten und von verschiedenen äufseren Umständen in genau derselben Weise beeinflufst werden.

Digitized by Google

Kapitel IV.

Darstellung und Wirkungsweise der Diastase.

Die Darstellung der Diastase im reinen Zustand ist bis jetzt noch nicht gelungen. In der That weifs man so wenig über ihre Zusammensetzung, dafs der Nachweis ihrer Reinheit in befriedigender Weise nicht geführt werden kann. Bis jetzt kann man nur sagen, dafs sie zweifellos ein stickstoffhaltiger Körper ist und dafs sie vieles mit den Eiweifskörpern gemein hat. So verhält es sich mit allen bis jetzt entdeckten Enzymen.

Die gewöhnliche Methode, einen diastatischen Auszug herzustellen, besteht darin, dafs man die Gewebe, in denen die Diastase vorkommt, zerkleinert und dann eine Zeit lang mit einem passenden Lösungsmittel behandelt, zum Schlufs die festen Bestandteile durch Filtration entfernt. Ein solcher Auszug kann natürlich nur als ein Präparat betrachtet werden, welches Diastase enthält neben anderen Bestandteilen des Gewebes, die in der Extraktionsflüssigkeit löslich sind.

Viele Versuche sind gemacht worden, um das Enzym frei von solchen Beimischungen darzustellen, und obwohl es mehrere Methoden giebt, mittelst deren man es von vielen der gewöhnlicheren Verunreinigungen befreien kann, so kann doch keine als vollkommen zufriedenstellend betrachtet werden. Eine der ältesten dieser Methoden wurde von *Cohnheim* benutzt, der sich eine der Klasseneigenschaften der Enzyme zu Nutze machte, nämlich die Möglichkeit, sie aus ihrer Lösung auszufällen durch irgend einen indifferenten Niederschlag, der in der enzymhaltigen Flüssigkeit erzeugt wird. Er arbeitete nach der folgenden Methode: Er fügte zum Speichel eine gewisse Menge Phosphorsäure und neutralisierte dann das Gemisch mit Kalkwasser, wodurch ein reichlicher Niederschlag von phosphorsaurem Kalk gebildet

Digitized by Google

wurde. Diese Fällung rifs einen grofsen Teil der Eiweifsstoffe des Speichels nieder, gleichzeitig mit der Diastase oder dem Ptyalin. Der Niederschlag wurde alsdann durch Filtration getrennt und mit einem Volum Wasser extrahiert, welches dem des ursprünglich angewandten Speichels entsprach. Die Diastase ist etwas leichter löslich als die Eiweifsstoffe. Er wiederholte diesen Prozefs mehrere Mal und fällte schliefslich den letzten Auszug durch Zusatz von Alkohol. Diese Fällung wurde gesammelt, mit Alkohol gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet; sie stellte alsdann ein amorphes Pulver dar, das weifs von Farbe und leicht löslich im Wasser war. *Cohnheim* glaubte, dafs es frei sei von Eiweifsstoffen, da seine Lösung nicht die gewöhnlichen charakteristischen Eiweifsreaktionen gab.

Eine zweite Methode zur Darstellung von Speicheldiastase ist von *Krawkow* beschrieben worden. Der Speichel wird mit einem gleichen Volumen Wasser verdünnt und mit neutralem Ammoniumsulfat gesättigt. Der dabei entstehende Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt und kurze Zeit mit starkem Alkohol ausgewaschen. Dann läfst man ihn 1—2 Tage unter absolutem Alkohol stehen und trocknet ihn schliefslich bei einer Temperatur von 30° C. Der wässerige Auszug wirkt diastatisch und giebt keine Eiweifsreaktion.

v. Wittich behandelte das Diastase enthaltende Gewebe mit Glycerin, fällte darauf mit Alkohol und reinigte das Produkt durch Wiederholung dieses Prozesses.

Mialhe stellte die Diastase aus dem Speichel durch blofses Fällen mit Alkohol dar. Wahrscheinlich erhielt weder er noch *v. Wittich* sie jemals in einem auch nur annähernd reinem Zustande.

Aus mehreren tierischen Geweben erhielt man eine gröfsere Ausbeute an Diastase, indem man zur ersten Extraktion statt Wasser eine 19prozentige Kochsalzlösung benutzte.

Lintner hat eine verhältnismäfsig reine Diastase aus Malz nach folgender Methode dargestellt: Ein Teil Grünmalz oder lufttrocknes Malz wurde 24 Stunden lang mit 2—4 Teilen 20prozentigem Alkohol extrahiert. Der Alkohol wurde dann abfiltriert und mit 2 1/2 Teilen seines Volumes absolutem Alkohol gemischt. Der entstehende Niederschlag wurde auf einem Filter

Digitized by Google

gesammelt und mit absolutem Alkohol gewaschen. Dann wurde er in einem Mörser unter Umrühren mit einer Mischung von absolutem Alkohol und Äther tüchtig gewaschen. Die Flüssigkeit wurde alsdann abgegossen, und der Niederschlag im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet; er hinterblieb als ein sehr wirksames gelblich weifses Pulver. Zur weiteren Reinigung wurde es wiederum in Wasser gelöst und abermals mit Alkohol gefällt; schliefslich wurde es noch der Dialyse unterworfen.

Die Analyse dieses Präparates ergab, dafs es Stickstoff und eine gewisse Menge Asche enthielt, die hauptsächlich aus Calciumphosphat bestand. Der Prozefs der Reinigung des ersten Produktes steigerte den Stickstoffgehalt, während der Aschengehalt fiel. Gleichzeitig wuchs die diastatische Kraft. Eine Probe, die im ersten Stadium 8,3 % Stickstoff enthielt, wies nach zweimaliger Reinigung durch wiederholtes Fällen 9,05 % Stickstoff auf und besafs nach darauffolgender Dialyse 9,9 % Stickstoff, während der Aschengehalt von 10,6 auf 4,79 % fiel.

Die diastatische Kraft des Präparates wurde in der Weise bestimmt, dafs man 3 ccm einer Lösung von 1 g Diastase in 250 ccm Wasser auf 10 ccm 2prozentiger Stärkelösung eine Stunde bei Zimmertemperatur einwirken liefs. Das Präparat wies vor der Reinigung eine diastatische Kraft = 96, nach der Reinigung eine solche = 100 auf.

Einen anderen Weg zur Darstellung der Diastase hat *Loew* eingeschlagen, der jedoch nicht so einwandfrei ist als der eben beschriebene. Das diastasehaltige Material wurde mit Wasser extrahiert, zum Auszug wurden lösliche Kalk- und Bleisalze hinzugefügt. Dannn wurde er mit Natron alkalisch gemacht, wodurch ein Niederschlag entstand, der die Diastase mit niederrifs. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in verdünnter Essigsäure gelöst und das Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt. Vom Schwefelblei wurde abfiltriert und aus dem Filtrat das Enzym mittelst 95 prozentigem Alkohol ausgefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, über Schwefelsäure getrocknet und mit Glycerin extrahiert.

Musculus benutzte eine Methode, die eine Modifikation der von *Payen* und *Persoz* war. Er teigte zerkleinertes Gerstengrünmalz eine Stunde lang mit der zweifachen Menge Wasser ein

Digitized by Google

und prefste alsdann ab. Zur trüben Flüssigkeit setzte er das gleiche Volumen Alkohol und filtrierte den entstehenden Niederschlag ab. Zum Filtrat setzte er abermals die gleiche Menge Alkohol, wobei ein geringerer Niederschlag ausfiel. Dieser wurde auf einem Filter gesammelt und bei mäfsiger Wärme getrocknet. Er erwies sich als stark diastatisch. So dargestellt konnte er eine ganze Zeit lang aufbewahrt werden.

Loew stellte das Enzym in einem wie er glaubte, verhältnismäfsig reinen Zustand nach folgender Methode dar: Gekeimte Gerste, die mit Wasser etwas eingeweicht war, wurde zwei Tage lang mit 4prozentigem Alkohol unter häufigem Umschütteln digeriert. Nach der Filtration wurde die Flüssigkeit mit zwei Raumteilen Alkohol und einem Raumteil Äther gefällt, der Niederschlag gesammelt, mit absolutem Alkohol gewaschen, über Schwefelsäure getrocknet und mit Wasser extrahiert. Auf Zusatz von basischessigsaurem Blei entstand ein Niederschlag, der abfiltriert und in Wasser suspendiert wurde. Zur Entfernung des Bleis wurde alsdann Schwefelwasserstoff hindurchgeleitet und das Schwefelblei abfiltriert. Zum Filtrat setzte er Alkohol-Äther, worauf die Diastase ausfiel. Diese wurde auf einem Filter gesammelt, mit absolutem Alkohol, dann mit Äther gewaschen und getrocknet. Die Darstellungsweise war mit einem beträchtlichen Verlust an Diastase verbunden und lieferte kein reines Produkt.

Einwirkung der Diastase auf Stärke.

Wenn man Stärkekleister von etwa 1—2 % mit einer kleinen Menge Diastaselösung mischt, so kann man eine Reihe von Veränderungen beobachten. In einigen Minuten verliert die Flüssigkeit ihre Opaleszenz, die von der suspendierten Stärke herrührt, die in Lösung geht, und wird klar. Wenn man zu diesem Zeitpunkt dem Gemisch einige Tropfen entnimmt und Jod zusetzt, so entsteht eine blaue Färbung, was beweist, dafs die Stärke chemisch unverändert geblieben ist (?). Nach einiger Zeit ändert sich die Jodreaktion, die Verzuckerungsflüssigkeit färbt sich mit Jod nunmehr purpurrot, noch später tiefrotbraun. Endlich bringt Jod überhaupt keine Färbung mehr hervor. Eine zeitweise Prüfung mittelst Fehlingscher Lösung zeigt, dafs das Kupferreduktionsvermögen, welches weder Stärke noch Diastase

Digitized by Google

besitzt, schnell zunimmt und mit fortschreitendem Prozeſs stets wächst.

Die Veränderungen, die sich in dem Stärkekleister unter der Einwirkung des Enzyms abspielen, sind daher augenscheinlich sehr verwickelter Natur. Der Prozeſs ist ein hydrolytischer, d. h. die Stärke zersetzt sich durch Einlagerung von Wasser in ihr Molekül, wobei zum Schluſs Zucker gebildet wird. Der Prozeſs ist jedoch ein langwieriger und stufenweiser, und Stärke und Zucker sind nicht die beiden einzigen Körper, die während der Umwandlung zugegen sind. Es finden sich auch noch gewisse andere Körper vor, die sogenannten Dextrine; eines dieser Dextrine bewirkt zu einem gewissen Zeitpunkt des Prozesses die braunrote Färbung mit Jod.

Den ersten Versuch, die einzelnen Stufen dieses Prozesses zu erforschen, machten *Payen* und *Persoz* im Jahre 1833. Diese Forscher erkannten eines der Dextrine und beschrieben es als einen in Wasser und verdünntem Alkohol löslichen Körper, der sich mit Jod nicht färbt. Im Jahre 1860 erkannte *Musculus*, daſs bei der Einwirkung der Diastase Dextrin und Zucker gleichzeitig gebildet werden. Er beschrieb es einige Jahre später als einen Körper, der sich mit Jod nicht färbe und kein Kupferreduktionsvermögen besitze. Er meinte, es werde von der Diastase nicht weiter angegriffen, sondern sei ein Endprodukt. *Payen* dagegen sagt, daſs es durch Diastase mit Leichtigkeit verzuckert wird.

In den Jahren 1871 und 1872 fanden *Grieſsmeyer, O'Sullivan* und *Brücke*, die unabhängig von einander arbeiteten, daſs mindestens zwei Dextrine gebildet werden, von denen eines mit Jod nicht, das andere dagegen rötlichbraun gefärbt wird. *Brücke* gab ihnen die Namen Achroodextrin und Erythrodextrin. *O'Sullivan* hielt sie damals noch für identisch und beschreibt sie als Körper ohne Reduktionsvermögen und mit einem spezifischen Drehungsvermögen $[\alpha]_j = +213^0$. Er führt weiter an, daſs Malzauszug sie beide in Maltose überführt.

Einige Jahre später zeigten *Musculus* und *Gruber*, daſs das Achroodextrin kein einheitlicher Körper war, sondern daſs es mindestens drei solcher Dextrine gab, die sich mit Jod nicht färbten. Als spezifisches Drehungsvermögen der drei Körper

Digitized by Google

gaben sie an $[\alpha]_j = + 159^0$, bezw. $+ 190^0$, bezw. 150^0. Aut Grund ihrer Versuche kamen diese Forscher zu einer Theorie des Verzuckerungsprozesses, die durch nachfolgende Forscher nur unwesentlich abgeändert wurde. Diese Theorie ging dahin, dafs das Stärkemolekül durch eine Reihe von Hydratationen und darauffolgende Zersetzungen zerfällt, wobei bei jedesmaligem Zerfall sich Maltose und gleichzeitig ein Dextrin von geringerem Molekulargewicht bildet.

Im Jahre 1879 wurde die Frage von *Brown* und *Heron* bearbeitet. Aus ihren Untersuchungen zogen sie den Schlufs, dafs dem Stärkemolekül die Formel $10\,C_{12}H_{20}O_{10}$ zukomme und dafs unter der Einwirkung der Diastase die $C_{12}H_{20}O_{10}$-Gruppen nach und nach abgespalten werden; der Rest sollte jedesmal ein Dextrin sein, dessen Molekulargewicht in jedem neuen Stadium geringer sei. Sie nehmen acht solcher Dextrine als möglich an. Jede abgespaltene Gruppe wird dann weiter zu Maltose hydrolysiert.

O'Sullivan kam in demselben Jahre zu dem Schlufs, dafs wahrscheinlich vier Dextrine gebildet werden, Erythrodextrin und drei Achroodextrine. Diese sollen in reinem Zustande kein Reduktionsvermögen besitzen und ein spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha]_j = + 222^0$ aufzuweisen.

Eine andere Ansicht über den Prozefs wurde um dieselbe Zeit von *Herzfeld* geäufsert. Nach diesem beruht die Verzuckerung der Stärke nicht in einer Spaltung des Moleküls, sondern es findet aufeinanderfolgend eine Umwandlung der Stärke in lösliche Stärke, Erythrodextrin und Achroodextrin statt; letzteres wird alsdann in einem Körper, den er M a l t o d e x t r i n genannt hat, und in Maltose übergeführt. Wird Stärke bei einer Temperatur unter 65^0 C. verzuckert, so bildet sich Maltose und Achroodextrin, über 65^0 C. dagegen aufserdem noch Erythrodextrin und Maltodextrin. *Herzfeld* denkt sich letzteres in der Weise zusammengesetzt, dafs zwei Dextringruppen mit einer Zuckergruppe von der Formel $C_6H_{12}O_6$ verbunden sind. *Herzfelds* Ansichten haben keine allgemeine Annahme gefunden, dagegen fand die Theorie von *Musculus* und *Gruber* mehr Anklang. Jedenfalls war sein Maltodextrin nicht rein.

Im Jahre 1885 stiefsen *Brown* und *Morris* die Ansichten von *Musculus* um; sie fanden, dafs bei der Stärkeverzuckerung

Digitized by Google

gewöhnlich 80 % Maltose und 20 % Dextrin gebildet wurden, wobei letzteres sich nur sehr schwer weiter verzuckern lassen soll. Unter ihren Verzuckerungsprodukten fand sich beständig eine gewisse Menge eines Körpers, der in seinen Eigenschaften zwischen Maltose und Dextrin stand; sie gaben diesem Körper den Namen Maltodextrin, der zuerst von *Herzfeld* gebraucht wurde. Der Körper unterschied sich jedoch wesentlich von dem von *Herzfeld* unter demselben Namen beschriebenen. *Brown* und *Morris* führen jedoch die Unterschiede darauf zurück, daſs *Herzfelds* Präparat unrein gewesen sei.

Ausgehend von der Beobachtung, daſs scheinbar nur vier Fünftel der Stärke leicht in Maltose übergeführt werden, stellten sie folgende Theorie auf: Die Stärke hat zum mindesten die Formel $5[(C_{12}H_{20}O_{10})_3]$ und besteht aus fünf Amylin- oder dextrinähnlichen Gruppen, von denen vier um die fünfte symmetrisch angeordnet sind. Durch die Wirkung der Diastase findet die Zersetzung in allmählichen Phasen statt, wobei jedesmal $(C_{12}H_{20}O_{10})_3$ abgespalten wird, während ein Dextrinrest verbleibt. Jede der so abgespaltenen Gruppen wird dann unter Wasseraddition hydrolisiert, wobei Maltodextrin $\begin{cases} C_{12}H_{22}O_{11} \\ (C_{12}H_{20}O_{10})_2 \end{cases}$ gebildet wird; dieses wird unter 65° C. in Maltose unter Aufnahme von zwei Molekülen Wasser weiter verzuckert. Die letzte Gruppe, um die die anderen vier angeordnet sind, wird nur sehr schwer verzuckert und bleibt infolgedessen als Dextrin am Schluſs der Verzuckerung übrig. Das Maltodextrin, das aus Maltose und Dextrin besteht, nennen sie Amyloïn.

Sie geben die Reaktionen des Maltodextims wie folgt an:

1. Es liefert bei der Analyse Zahlen, die berechtigen, es in seiner Zusammensetzung als ein Gemenge von Maltose und Dextrin anzusprechen.
2. Es kann nicht in Maltose und Dextrin zerlegt werden und ist daher kein Gemisch, sondern eine Verbindung.
3. Es wird von Diastase vollkommen in Maltose verwandelt, während ein Gemenge von Maltose mit Dextrin in demselben Verhältnis stets einen Dextrinrückstand hinterläſst.
4. Es wird in der Hauptgärung von Hefe nicht vergoren.

Später, im Jahre 1889, kommen sie, obwohl sie der Grup-

Digitized by Google

pierungs- und Spaltungstheorie noch anhängen, zu dem Ergebnis, dafs anstatt eines Maltodextrins, deren mehrere gebildet werden. Sie sind nunmehr der Ansicht, dafs das Stärkemolekül viel gruppenreicher ist, als sie auf Grund ihrer ersten Versuche annehmen. Sie drücken die erste Zersetzung durch folgende Gleichung aus:

$$5[(C_{12}H_{20}O_{10})_{20}] = (C_{12}H_{20}O_{10})_{20} + 4[(C_{12}H_{20}O_{10})_{20}].$$

Die vier Amylingruppen können allmählich vollständig in Maltose übergeführt werden, wobei eine ganze Reihe von Amyloïnen der verschiedensten Zusammensetzung gebildet werden, wobei mit fortschreitender Verzuckerung die Moleküle bald kleiner werden, bis schliefslich Maltose gebildet wird. Das erste und das letzte Stadium dieses Prozesses können durch folgende Gleichungen dargestellt werden:

$$(C_{12}H_{20}O_{10})_{20} + H_2O = \begin{cases} C_{12}H_{22}O_{11} \\ (C_{12}H_{20}O_{10})_{19} \end{cases},$$

$$(C_{12}H_{20}O_{10})_{20} + 19\,H_2O = \begin{cases} (C_{12}H_{22}O_{11})_{19} \\ C_{12}H_{20}O_{10} \end{cases}.$$

Mit fortschreitender Hydrolyse werden diese komplexen Amyloïne in kleinere abgebaut, von denen zwei von den beiden genannten Forschern dargestellt wurden; sie nennen sie Maltodextrin $\begin{cases} C_{12}H_{22}O_{11} \\ (C_{12}H_{20}O_{10})_2 \end{cases}$ und Amylodextrin $\begin{cases} C_{12}H_{22}O_{11} \\ (C_{12}H_{20}O_{10})_6 \end{cases}$. Die letzte Verbindung wurde zuerst von *Nägeli* im Jahre 1874 beobachtet. Er hielt sie irrtümlicherweise für identisch mit löslicher Stärke.

Ein merkwürdiger Unterschied ist festzustellen, wenn man die Diastase auf Stärkekleister in der Kälte einwirken läfst. Das Drehvermögen der Verzuckerungsprodukte ist kleiner, als es die ausschliefsliche Bildung von Maltose und Dextrin vermuten läfst. Nach einigem Stehen, oder nach dem Aufkochen verschwinden diese Widersprüche und das Reduktions- und Drehungsvermögen stehen in demselben Verhältnis wie bei der Durchführung des Verzuckerungsprozesses bei höheren Temperaturen. Als Erklärung wird angegeben, dafs bei niederer Temperatur die gebildete Maltose nicht die volle Kraft hat, den polarisierten Strahl abzulenken, da sie im Zustand der »Halbrotation« gebildet werde. Frisch bereitete Maltoselösungen zeigen immer diese Eigentümlichkeit. Das Rotationsvermögen einer frischen Maltoselösung steht zu dem

Digitized by Google

einer alten oder aufgekochten im Verhältnis von 133° zu 150°. *Brown* und *Morris* haben gezeigt, dafs dieses Verhältnis sich bestätigt bei frischen Stärkeverzuckerungsprodukten.

Aus diesen Untersuchungen scheint zweifellos hervorzugehen, dafs die Stärkeverzuckerung ein stufenweiser und zusammenhängender Prozefs ist. Eine andere Anschauung hat kürzlich *Mittelmeier* kund gegeben, die in vielen Einzelheiten von der von *Brown* und *Morris* abweicht. Nach *Mittelmeier* verläuft die Einwirkung der Diastase auf Stärke in zwei Phasen; während der ersten wird ein kleiner Teil der Stärke rasch in Amylodextrin, Erythrodextrin, Achroodextrin und Zucker übergeführt; diese Dextrine sind jedoch nicht identisch mit den in der zweiten Phase gebildeten. *Mittelmeier* spricht sie als primäre und sekundäre Dextrine an. Er behauptet, primäres Erythrodextrin und primäres Achroodextrin dargestellt zu haben. Ersteres ist unlöslich in Wasser, besitzt ein spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha]_D =$ etwa $+170°$, reagiert nicht mit Phenylhydrazin, reduziert Kupferoxyd und liefert bei der Behandlung mit Diastase Dextrose und Maltose. Für das andere primäre Dextrin giebt er keine Reaktionen an. Der aus den primären Dextrinen gebildete Zucker liefert Maltosazon, während das der sekundären Dextrine ein bei 145 bis 148° C. schmelzendes Osazon liefert. *Mittelmeier* hält es für den Abkömmling eines neuen Zuckers, den er Metamaltose nennt.

Seine Ergebnisse sind bis jetzt nicht bestätigt worden.

Der unter der Einwirkung von Diastase gebildete Zucker ist, nach Angabe der meisten Forscher, Maltose, wenn die Umwandlung der Stärke unter den gewöhnlichen Laboratoriumsbedingungen vor sich geht. Viele Forscher jedoch haben gefunden, dafs unter besonderen Umständen auch Dextrose vorkommt, und dies war der Anlafs zu Zweifeln an der Identität des Enzyms in verschiedenen Sekretionen.

Maltose und Dextrose sind wesentlich von einander verschiedene Zucker; Maltose ist der komplexere, und ein Molekül derselben spaltet sich unter gewissen Umständen in zwei Moleküle Dextrose. Die Dextrose ist farblos und krystallinisch. Aus Wasser krystallisiert sie in sechsseitigen Tafeln oder Prismen oder in warzigen Klumpen. Die Krystalle lösen sich langsam in kaltem, schnell in heifsem Wasser, sind schwach löslich in kaltem, leichter

Digitized by Google

in heifsem Alkohol. Die Lösung dieses Zuckers besitzt ein spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha]_D = + 52{,}5$. Beim Erhitzen mit *Fehling*scher Lösung reduziert sie das Kupferoxyd zu Oxydul. Auf diese Eigenschaft gründet sich die quantitative Bestimmung der Dextrose, da diese die Kupferlösung in einem ganz bestimmten Verhältnis reduziert.

Beim Erwärmen mit essigsaurem Phenylhydrazin bildet sich ein in gelben Nadeln krystallisierendes Osazon. Es ist fast unlöslich in Wasser und schmilzt bei etwa 205° C. Dextrose unterliegt der alkoholischen Vergärung mit Hefe ohne voraufgegangene Zersetzung. Sie hat die Zusammensetzung $C_6 H_{12} O_6$ und wird durch die Formel $[COH - (CHOH)_4 - CH_2OH]$ ausgedrückt.

Maltose krystallisiert aus wässeriger Lösung nur schwer und zwar in feinen Nadeln. Sie ist sehr leicht löslich in Wasser, in Alkohol dagegen nicht so leicht als Dextrose. Ihr spezifisches Drehungsvermögen ist viel gröfser als das der Dextrose, nämlich $[\alpha]_D = + 140^{\circ}$. Ihr Reduktionsvermögen ist andererseits bedeutend geringer, nämlich nur etwa $^2/_3$ von dem der Dextrose.

Maltose bildet mit essigsaurem Phenylhydrazin ein in gelben Nadeln krystallisierendes Osazon, das dem Glukosazon ähnelt, jedoch bei 100° C. in etwa 75 Teilen Wasser löslich ist. Sein Schmelzpunkt liegt bei 205° C.

Die Chemiker sind übereinstimmend der Ansicht, dafs die Pflanzendiastase aus Stärke Maltose und nicht Dextrose bildet. Etwas widersprechende Angaben sind hinsichtlich der tierischen Diastase gemacht worden. *Musculus* giebt an, dafs die pflanzliche Diastase und das tierische Ptyalin denselben Zucker liefern. *Nasse* hingegen behauptet, der Speichel bilde einen dritten, von Maltose und Dextrose verschiedenen Zucker; er nennt ihn Ptyalose und schreibt ihm ein nur halb so grofses Reduktionsvermögen als der Dextrose zu. Die Veränderungen, die sich in dem Leben zu Lebzeiten als auch nach dem Tode abspielen, führen zur Bildung von Dextrose in den Leberzellen; Diastase bildet jedoch aus Glykogen Maltose. *Nasse* und einige andere Forscher behaupten, es sei Ptyalose. *Bial* giebt an, das Blutserum bilde Dextrose und nicht Maltose.

Diese widersprechenden Angaben klären sich jedoch auf im Lichte meiner Untersuchungen. Wie Fräulein *Tebb* gezeigt hat,

Digitized by Google

enthält die Leber aufser der hypothetischen Diastase noch ein anderes Enzym, Glukase oder Maltase, das Maltose in Traubenzucker überführt. Die anderen tierischen Gewebe, von denen schon die Rede war, z. B. Blut und Lymphe, enthalten dieses Enzym ebenfalls. Unter der Wirkung der Diastase entsteht in allen diesen Fällen Maltose, die aber von der Maltase hinterher schnell in Dextrose verwandelt wird. Dieses Enzym, das erst in jüngster Zeit entdeckt worden ist, wird in einem späteren Kapitel besprochen werden.

Eine sehr umfangreiche Diskussion hat die Frage entfesselt, ob bei der Stärkeverzuckerung durch Diastase nicht zwei Arten von Maltose gebildet werden. *Fischer* hat durch Einwirkung von Salzsäure auf Glukose einen Zucker dargestellt, der verschiedene charakteristische Eigenschaften besitzt und dem er den Namen Isomaltose beigelegt hat.

Im Jahre 1891 behauptete *Lintner*, diesen Zucker in Bierwürzen gefunden zu haben. Er gab an, beim Erhitzen derselben mit essigsaurem Phenylhydrazin bilde sich ein Osazon, dessen Schmelzpunkt und Krystallform mit dem des neuen Zuckers von *Fischer* übereinstimme. Später gab *Lintner* an, dafs er in Gemeinschaft mit *Düll* diesen Körper isoliert habe und machte auch Angaben über dessen Darstellung aus den Stärkeumwandlungsprodukten. Nach diesem Forscher ist die Isomaltose ein Zucker, der mit Hefe viel langsamer vergärt als Maltose; er sei sehr hygroskopisch und von sehr süfsem Geschmack. Sein spezifisches Drehungsvermögen sei gleich dem der Maltose, nämlich $[\alpha]_D = + 140^\circ$, sein Reduktionsvermögen jedoch nur 83 % von dem der Maltose. Durch Diastase werde er in Maltose übergeführt. Mit essigsaurem Phenylhydrazin bilde er ein Osazon, das bei 150 bis 153° schmelze.

In einer im Jahre 1895 erschienenen Abhandlung giebt *Lintner* an, die Umwandlung in Maltose sei unvollständig; manchmal wurden nur 30 % umgewandelt. Er gelangt zur weiteren Annahme, dafs möglicherweise zwei stereoisomere Isomaltosen existieren. *Lintners* Ansichten wurde von verschiedenen Forschern widersprochen. *Ulrich* wiederholte die *Lintner*schen Versuche, konnte jedoch kein unter 159° schmelzendes Osazon erhalten; der Schmelzpunkt des *Lintner*schen Körpers liegt einige Grad tiefer.

Digitized by Google

Ling und *Baker* stellten letzteren dar, und aus dem Verhalten desselben unter verschiedenen Verhältnissen schlossen sie, dafs es kein homogener Körper sei.

Brown und *Morris* studierten ihn genau und stimmten mit *Ling* und *Baker* überein, dafs es kein einheitlicher Körper sei und ganz und gar nicht mit *Fischers* Isomaltose übereinstimme. Sie geben an, dafs er durch sorgfältige Fraktionierung und durch Gärung mit Hefe weiter zerlegt werden kann, so zwar, dafs man zu dem Schlufs berechtigt sei, er sei ein Gemenge von Maltose und einem dextrinartigen Körper aus der Maltodextrin- oder Amyloïnklasse. Das krystallisierende Osazon, das *Lintner* als Isomaltosazon beschreibt, und auf das er in der Hauptsache seine Ansichten gründet, sei ein Maltosazon, das in seinem krystallinischen Habitus und in seinem Schmelzpunkt durch die Gegenwart kleiner, aber wechselnder Mengen einer anderen Substanz beeinflufst werde. *Brown* und *Morris* haben dies gezeigt durch Umkrystallisieren reinen Maltosazons bei Gegenwart der nicht krystallisierenden Produkte, die bei der Einwirkung von Phenylhydrazin auf Maltodextrin erhalten werden; sie erhielten auf diese Weise einen Körper von den Eigenschaften des *Lintner*schen. *Ling* und *Baker* unterstützen diese Ansicht; sie glauben aber, dafs die der Maltose beigemischte Substanz ein einfaches Dextrin von der Formel $C_{12} H_{20} O_{10} + H_2 O$ sei.

Jalowetz bestätigt die Angaben von *Brown* und *Morris*, indem er nachweist, dafs reine Maltose, mit verschiedenen Mengen Dextrin gemischt, Osazone liefert, die sich nicht nur im Schmelzpunkte unterscheiden, sondern auch in ihrem Aussehen und in der Krystallform. Ein Gemisch von gleichen Teilen Maltose und Dextrin liefert ein Osazon vom Schmelzpunkt 150—155°; der Schmelzpunkt ändert sich aber nach mehrmaligem Umkrystallisieren.

Ost widerspricht ebenfalls *Lintners* Ansichten.

Die Wahrscheinlichkeit ist sonach sehr grofs, dafs bei der Einwirkung von Diastase auf Stärke nur ein Zucker und zwar Maltose entsteht.

Die Entstehung der Isomaltose durch die Einwirkung thierischer Enzyme ist auch behauptet, jedoch nicht klar bewiesen worden. Wahrscheinlich werden weitere Versuche zeigen, dafs in keinem der beiden Fälle Isomaltose isoliert wurde. *Külz* und

Digitized by Google

Vogel haben Untersuchungen über die Wirkung der hauptsächlichsten tierischen diastatischen Sekretionen mit besonderer Bezugnahme auf die dabei gebildeten Zucker veröffentlicht. Sie benutzten 5prozentige Reisstärkelösungen und identifizierten die gebildeten Zucker durch ihre Osazone. Als Ergebnis ihrer Versuche geben sie an:

Menschlicher Parotiden-Speichel (Speichel der Ohrenspeicheldrüse) — Isomaltose.

Gemischter menschlicher Speichel — Isomaltose, später Maltose, mit Spuren Dextrose.

Hundespeichel — Isomaltose.

Ochsenpankreas — Isomaltose.

Bei Benutzung von Glykogen statt Stärke finden sie:

Mit Leberglykogen gab menschlicher Parotiden-Speichel ein Gemenge von Isomaltose und Maltose im Verhältnis von 1 : 2.

Mit Muskelglykogen gab derselbe Speichel nur Maltose bei Speichelüberschufs; mit weniger Speichel erhielten sie Isomaltose mit etwas Maltose und Dextrose.

Mit Leberklykogen liefert Ochsenpankreas Isomaltose nebst einer Spur Maltose.

Mit Muskelglykogen gab dasselbe Enzym Isomaltose mit etwas Dextrose. Die im tierischen Körper durch Diastase gebildeten Stärkeumwandlungsprodukte differieren jedenfalls etwas von den im Laboratorium erhaltenen. Wir haben gesehen, dafs im letzteren Fall die Endprodukte gewöhnlich Maltose und Dextrin sind, im Verhältnis von 4 : 1; das Dextrin bildet die unangreifbare Gruppe, um die die vier leicht verzuckerbaren Gruppen angeordnet sind. Im Körper scheint das Endprodukt nur Maltose zu sein. *Lea*, der diese Thatsache endgiltig feststellt, begründet dies damit, dafs die Maltose sofort nach ihrer Bildung der diastatischen Wirkung entrückt werde. Er sagt, wenn im Laboratorium die Verzuckerung in Dialysier-Röhren vorgenommen werde, die aus Pergamentpapier bestehen und in Wasser eingetaucht sind, das öfters erneuert wird, so sei das Endprodukt nur Maltose. Dies steht im Einklang mit den Angaben vieler Forscher, dafs die Enzyme in ihrer Wirkung gehemmt, wenn nicht gänzlich gehindert werden durch die Anhäufung ihrer Umsatzprodukte.

Digitized by Google

Die Produkte, die in der Pflanze während der Diastasewirkung gebildet werden, sind noch nicht ausreichend studiert worden. Zweifellos ist der Zucker das hauptsächlichste Produkt, wenn nicht das einzige, da die Dextrine ebenso wenig diffusibel sind als Stärke selbst. Die Untersuchungen von *Brown* und *Morris* über die Laubblätter lassen keinen Zweifel darüber, dafs in Tropaeolum dieser Zucker in jedem Fall Maltose sei.

Der Verfasser konnte im Verlauf einiger Untersuchungen über die Keimung der Pollenkörner gewisse Veränderungen beobachten in den darin enthaltenen Stärke-Reservestoffen zur Zeit, als der Pollenschlauch sich ausbildete. Die besten Resultate wurden mit den Pollen von Lilium pardalinum erhalten. Die reifen Pollenkörner enthielten reichlich Stärkekörner, die sich beim Versetzen mit einer Lösung von Jod in Chloralhydrat, welches sie durchscheinend macht, blau färbten. Dazwischen befanden sich einige Körner, die mit Jod die Erythrodextrinreaktion gaben. Als der Pollenschlauch aus dem Pollenkorn heraustrat, gingen diese Körnchen allmählich in den ausgewachsenen Teil über und strömten langsam mit dem wachsenden Pollenschlauch in diesen hinab. Als der Schlauch zweimal so lang war als das Pollenkorn, färbten sich die Körnchen auf Zusatz von Chloralhydratjodlösung etwas anders, nämlich schwach purpurn. Mit dem weiteren Wachstum des Pollenschlauches wurde diese Erscheinung immer ausgeprägter, hauptsächlich am Ende des Schlauches. Als der Schlauch etwa die 20—30fache Länge des Pollenkornes erreicht hatte, war die Wirkung der Jodlösung eine ganz andere. Da traten nur wenige blaue Körnchen auf und zwar in der nächsten Nähe des Pollenkornes. Der gröfsere Teil des Schlauches war dicht mit purpurnen Körnern besetzt, gegen das Ende des Schlauches hin wurden sie nahezu rot. Die Stärke war augenscheinlich unter dem Einflufs der Diastase in Verzuckerung begriffen, denn Parallelversuche hatten ergeben, dafs die Pollenkörner dieses Enzym enthielten. Die Körnchen änderten ihre Form nicht und wiesen keine Anzeichen von Korrosion auf, selbst bei starker Verzuckerung nicht. Die Veränderung der Stärke hatte offenbar durch das ganze Korn hindurch Platz gegriffen.

Diese Versuche, obwohl sie keinesfalls erschöpfend sind,

Digitized by Google

zeigen, dafs der Verlauf der Verzuckerung der Stärke in der Pflanze derselbe ist wie der im Laboratorium.

Man kann die Betrachtungen über die Umwandlung der Stärke nicht abschliefsen, ohne auch von den im Jahre 1890 von *Wijsman* veröffentlichten Arbeiten Notiz zu nehmen. Bei allen bislang beschriebenen Experimenten war angenommen worden, dafs die Diastase ein einheitliches Enzym sei. *Wijsman* hält diese Annahme nicht für richtig, er glaubt vielmehr, dafs sich unter diesem Namen zwei Körper verbergen; einen derselben nennt er Maltase, die jedoch nicht das unter diesem Namen bereits mehrfach angeführte Enzym ist, sondern viel mehr der Diastase selbst entspricht, insofern als sie Stärke in ein Gemenge von Maltose und Erythrodextrin verwandelt. Das zweite Enzym nennt er Dextrinase, der er die Bildung des Maltodextrins von *Herzfeld* und *Brown* und *Morris* zuschreibt. Mit den andern Forschern stimmt er darin überein, dafs Maltodextrin durch seine Maltase in Maltose verwandelt wird, behauptet jedoch weiter, dafs Erythrodextrin durch die Dextrinase in ein Dextrin verwandelt wird, das er Leukodextrin nennt, das Kupferoxyd nicht reduziert und sich mit Jod nicht färbt. Um die Anwesenheit der beiden Enzyme in dem diastatischen Malzauszug zu zeigen, stellte er seine Versuche derart an, dafs die Diastase in eine Masse hineindiffundieren konnte, die er in der Weise herstellte, dafs er zu einer Lösung von *Lintners* löslicher Stärke Gelatine setzte. Wenn er auf die Gelatinemasse etwas Diastaselösung brachte, so konnte er den Fortgang der Verzuckerung verfolgen durch zeitweiliges Anfeuchten der Gelatine mit Jodlösung. Nach 1 bis 2tägiger Einwirkung bildete die so behandelte Fläche eine farblose Zone, die von einem violetten Ring begrenzt war, während die Gelatine mit unveränderter Stärke blau gefärbt wurde. Hieraus schlofs *Wijsman*, dafs die beiden Enzyme in die Gelatine in verschiedenem Mafse diffundieren, je nach ihrer Konzentration. Der violett gefärbte Ring zeigte, dafs die Maltase über die Dextrinase hinaus vorgedrungen war, während in der ungefärbten Fläche beide anwesend waren. Wurde ein Teil der violett gefärbten Zone entfernt, auf eine frische Gelatinehaut gelegt und mit Enzym versetzt, so wurde keine ungefärbte Zone beobachtet, sondern alles wurde mit Jod violett gefärbt.

Digitized by Google

Wijsmanns Versuche können aber auch ganz gut so gedeutet werden, daſs das Verzuckerungsenzym nur einheitliche Diastase ist; seine fortschreitende Wirkung würde es verständlich machen, warum das Centrum der Einwirkungszone ungefärbt war, während der violettgefärbte Rand die früheren Stadien des Verzuckerungsprozesses andeuten würde. Der aus dieser Zone entfernte Anteil würde verhältnismäſsig wenig Diastase enthalten, und deswegen würde die violette Reaktion eine beträchtliche Zeit anhalten, wenn man ein solches Stück auf Stärkegelatine einwirken läſst.

Die *Wijsmann*sche Hypothese ist daher sehr unwahrscheinlich.

Wirkung der Diastase auf Glykogen.

Die Hydrolyse des Glykogens durch verdünnte Säuren scheint dem entsprechenden Stärkeverzuckerungsprozeſs ganz zu entsprechen. Aus den neueren Untersuchungen von Fräulein *Tebb* ergiebt sich, daſs eine opaleszierende Glykogenlösung beim Erhitzen mit 1 $^0/_0$ Salzsäure noch unterhalb der Siedetemperatur sehr rasch klar und durchsichtig wird. Wenn man in diesem Stadium die Erwärmung unterbricht und die Flüssigkeit neutralisiert, so färbt sich die Lösung mit Jod rot und reduziert *Fehling*sche Lösung. Der Zucker kann durch Dialyse entfernt werden; beim Sättigen mit Ammoniumsulfat scheidet die Flüssigkeit dann einen gummösen Niederschlag aus, der aus löslichem Glykogen besteht. Nach vollständiger Entfernung dieses Körpers dialysiert man die Flüssigkeit mehrere Tage zur Entfernung des Ammoniumsalzes. Wenn man dann die Flüssigkeit konzentriert und mit einem Überschuſs von Alkohol versetzt, so scheidet sich ein Erythrodextrin aus.

Bei längerer Einwirkung der Säure, 1—2 Stunden lang, verändert sich sowohl das lösliche Glykogen, als auch das Dextrin, so daſs Jod keine Färbung mehr giebt. Auf Zusatz von Alkohol fällt aber ein anderes Dextrin aus, das zur Achroogruppe gehört, das ebenso wie das zuerst gebildete Erythrodextrin durch Ammoniumsulfat nicht gefällt wird.

Fräulein *Tebb* machte folgende Angaben über die zur Fällung der Stärke und des Glykogens, sowie ihrer Verzuckerungszwischenprodukte nötigen Mengen Alkohol:

Digitized by Google

	Prozente Alkohol nötig zur Einleitung der Fällung	Prozente Alkohol nötig zur vollständigen Fällung
Stärke und ihre Abkömmlinge		
Stärkekleister	5	27
Lösliche Stärke	12	60
Erythrodextrin	45	90
Glykogen und seine Abkömmlinge		
Glykogen	35,5	55
Lösliches Glykogen	44	50
Erythrodextrin	44	90
Achroodextrin	65	90

Die Wirkung der Speichel- oder Malzdiastase unterscheidet sich etwas von der der verdünnten Säuren. Es bildet sich nämlich dabei scheinbar kein lösliches Glykogen oder Erythrodextrin, sondern es wird stets Achroodextrin gebildet. Man kann vielleicht annehmen, dafs die Wirkung in den ersten Stadien des Prozesses so schnell ist, dafs die beiden erstgenannten Körper direkt weiter verzuckert werden. Aufserdem tritt aber ein neues Dextrin auf, das der Achroogruppe angehört und das sich dadurch auszeichnet, dafs es nicht in Zucker übergeführt werden kann. Diesem Körper hat Fräulein *Tebb* den Namen Dystropodextrin beigelegt und ihn mit einer Substanz identifiziert, die schon früher von *Seegen* aus Glykogen erhalten worden und mit demselben Namen belegt worden war. Dieses Dextrin scheint sich von dem anderen Dextrin dadurch zu unterscheiden, dafs zu dessen Ausfällung gröfsere Mengen Alkohol nötig sind.

Das aus der Leber dargestellte Enzym wirkt ähnlich.

Der aus dem Glykogen durch Diastase gebildete Zucker scheint nach den Angaben von Fräulein *Ewes* und anderen ausschliefslich Maltose zu sein. Das Leberenzym liefert Dextrose, wie mit Stärke; dies ist aber, wie bereits erwähnt, auf die Glukase zurückzuführen, die neben der Diastase in diesem Organ vorkommt.

Digitized by Google

Kapitel V.

Bedingungen der Diastasewirkung.

Im vorhergehenden Kapitel wurde die Wirkung der Diastase lediglich im allgemeinen besprochen; viele Punkte der diastatischen Hydrolyse jedoch bedürfen einer genaueren Prüfung. Bei einem Vergleich der beiden pflanzlichen Diastasen zeigte es sich, dafs die Translokationsdiastase die Stärkekörner ohne Korrosion löst, während die sogenannte Sekretionsdiastase das Korn vor der Verzuckerung zerstört. Vergleicht man diese beiden Diastasen in Bezug auf ihre Wirkung auf Stärkekleister und auf eine Lösung von löslicher Stärke, so bestätigt sich abermals der Unterschied dieser beiden Diastasen. Das Enzym des Schildchenepithels verflüssigt Stärkekleister sehr schnell, während das Enzym des vegetativen Teiles der Pflanze dies nur in sehr geringem Mafse vermag, obwohl es gelöste Stärke mit der gröfsten Leichtigkeit zu verzuckern vermag. Das Vermögen, Stärkekleister zu verflüssigen und das, die Stärkekörner zu zerfressen, scheint Hand in Hand zu gehen und eine hervorstechende Eigenschaft der Sekretionsdiastase zu sein. Dieses Vermögen kann daher getrennt von der hydrolytischen Wirkung bestimmt werden, welch letztere beiden Varietäten gemeinsam ist. Wir können in der That sprechen von dem Stärke-Verflüssigungsvermögen und dem Stärke-Verzuckerungsvermögen als zwei ganz getrennten Faktoren, obwohl wir kein Enzym kennen, welches die erstgenannte Wirkung ohne die letztgenannte auszuüben vermag. Beide Eigenschaften der Diastase können modifiziert werden, je nach den Versuchsbedingungen, unter denen man das Enzym wirken läfst.

Der Verlauf der Verzuckerung ist ferner in hohem Mafse abhängig von der Art der zu verzuckernden Stärke. *Baranetzky* hat hierüber viele Untersuchungen ausgeführt mit dem Ergebnis,

Digitized by Google

dafs unverkleisterte Kartoffelstärke gegen Diastase sehr widerstandsfähig ist, während die Stärke der meisten Samen sehr leicht angegriffen wird. Buchweizenstärke scheint am leichtesten verzuckert zu werden.

Diastasen verschiedenen Ursprunges scheinen die Verzuckerung in verschiedenem Grade einzuleiten und durchzuführen. *Roberts* hat äquivalente Mengen vieler Präparate verglichen und ist dabei zu folgenden Ergebnissen gelangt, wobei er die Pankreasdiastase des Schweines als Einheit zu Grunde legte.

Pankreassaft des Schweines . .	100
Menschlicher Speichel	10—17
Pankreassaft des Schafes . . .	12
„ „ Ochsen . . .	11
Malzdiastase bei 60° C. . . .	10
„ „ 40° C. . . .	4—5
Menschlicher Harn	0,3—1,3.

Die Empfindlichkeit der Diastase gegen Temperaturunterschiede ist eine Eigenschaft, die sie mit den meisten anderen Enzymen teilt. In jedem Falle ist das Enzym bei 0° wirkungslos; mit steigender Temperatur erreicht ihre Wirkung ein Optimum, d. h. einen Punkt, bei dem sie am besten wirkt. Über diesen Punkt hinaus fällt ihre Wirksamkeit mit steigender Temperatur bis zu einem anderen Punkte, bei dem sie zerstört wird und zu wirken aufhört. Wir haben es also mit einer Niedrigst-, einer Höchsttemperatur und einem Punkte der höchsten Wirksamkeit zu thun. Man kann dies in Form einer Kurve ausdrücken, deren Abscissen durch die Temperaturgrade und deren Ordinaten durch den Grad der Wirksamkeit bei diesen Temperaturgraden, gemessen durch die kupferreduzierende Kraft der Verzuckerungsprodukte der Verzuckerungsflüssigkeit innerhalb derselben Zeit repräsentiert werden.

Wenn wir die beiden Kurven der beiden Arten pflanzlicher Diastase mit einander vergleichen, so finden wir, dafs die Translokationsdiastase an ihrem Niedrigstpunkte schärfer ansteigt, als die Sekretionsdiastase, denn bei 4° C. ist diese bereits so hoch, als letztere bei 14,5° C. Sie erreicht den Punkt ihrer höchsten Wirkung (Optimum) bei 45—50° C. und fällt dann ab. Die Kurve der Sekrektionsdiastase zeigt, obwohl langsam ansteigend,

Digitized by Google

den Punkt ihrer günstigsten Wirkung erst bei 50—55° C. Die vollständigen Kurven der Wirkung der beiden Diastasearten sind von *Lintner* und *Eckhardt* veröffentlicht worden.

Müller hat Zahlen über das relative Stärkeverzuckerungsvermögen der Diastase bei verschiedenen Temperaturen angegeben. Er führte die Verzuckerungen durch bei 0°, 10°, 20°, 30° und 40° C. und fand das Verhältnis der gebildeten Zuckermengen wie 7 : 20 : 38 : 60 : 98.

Das Optimum des Speichel- und Pankreasenzyms unterscheidet sich wieder von dem der beiden Pflanzendiastasen und liegt wahrscheinlich bei 38—40° C., der Körpertemperatur.

Einige Untersuchungen, die *Effront* im Jahre 1892 und den darauffolgenden Jahren ausgeführt hat, lassen es wahrscheinlich erscheinen, dafs die Wirkung der Diastase wesentlich beeinflufst wird durch Veränderungen des Mediums, in welchem sie wirkt. Er hat gefunden, dafs die Malzdiastase in ihrer Wirkung unterstützt wird durch kleine Spuren von Mineralsäuren, eine Thatsache, die bereits früher von *Baranetzky* mitgeteilt worden ist. Etwas gröfsere Mengen neutraler Salze, z. B. Kochsalz, haben dieselbe Wirkung. *Effront* hat ferner gefunden, dafs es drei Klassen von Körpern giebt, die ein ausgesprochenes Vermögen besitzen, die Wirksamkeit der Diastase zu erhöhen, nämlich Aluminiumsalze, Phosphorsäureverbindungen und verschiedene Amidkörper, unter denen besonders das Asparagin sich hervorthut. In seiner ersten Abhandlung teilt *Effront* einige Untersuchungen mit, die das oben Gesagte ganz schlagend darthun.

Er arbeitete nach folgender Methode. Er teigte eine bestimmte Menge Malz mit dem 40fachen seines Gewichts Wasser ein und filtrierte nach einiger Zeit. Mit dem Filtrat verzuckerte er dann Lösungen von löslicher Stärke bei Gegenwart der die Verzuckerung beeinflussender Substanzen. Es ergab sich folgendes:

Malzauszug ccm	Stärkelösung ccm	Benutzte Fremdsubstanz %	Gebildete Maltose
1	200	0	8,63
1	200	0,7 saure sphosphorsaures Ammoniak	51,63
1	200	0,5 Calciumphosphat	46,12
1	200	0,25 Ammoniakalaun	56,3

Digitized by Google

Malz-auszug ccm	Stärke-lösung ccm	Benutzte Fremdsubstanz %		Gebildete Maltose
1	200	0,25	Kalialaun	54,32
1	200	0,25	essigsaure Thonerde	62,4
1	200	0,02	Asparagin	37,0
1	200	0.05	Asparagin	61,2

Es wurden dieselben Ergebnisse erhalten, gleichviel welche Verzuckerungstemperatur gewählt wurde.

Es machte auch keinen Unterschied, ob nun die Diastase vor dem Zusatz zur Stärke oder erst während des Verzuckerungsprozesses mit den Reagentien versetzt worden war.

In einer späteren Abhandlung teilt *Effront* mit, dafs eine Infusion von Rohfrucht, in der Kälte hergestellt, filtriert und zur Zerstörung der aus dem Korn stammenden Diastase aufgekocht, einen zwar geringeren, aber ähnlichen Effekt besitzt, wobei die diastatische Kraft des Malzes oft verdreifacht wird.

Bei diesen Versuchen tritt der Unterschied in den beiden Wirkungsweisen der Diastase sehr klar zu Tage. Die angewandten Reagentien beeinflussen die hydrolytische Wirkung in der beschriebenen Weise, sie haben jedoch nur wenig oder keinen Einflufs auf das Stärkekleister-Verflüssigungsvermögen.

Der Einflufs dieser Reagentien kann nur in den früheren Stadien der Verzuckerung beobachtet werden; das Maximum wird erreicht, wenn ungefähr 25% der Stärke in Maltose umgewandelt sind. Darüber hinaus nimmt der Einflufs ab, und bei Gegenwart von viel Diastase, so dafs in kurzer Zeit 60—70% der Stärke verzuckert werden, ist er nur noch sehr gering.

Die praktische Nutzanwendung dieser Ergebnisse konnte also auf keinen Fall eine so grofse sein, als es auf den ersten Blick schien.

Effront hat ferner gefunden, dafs das Verflüssigungs- und Verzuckerungsvermögen der Malzauszüge in keinem bestimmten Verhältnis stehen, sondern in bestimmten Fällen sehr variieren; die Abweichungen hängen in erster Linie von der Art der Malzbereitung ab.

Andere Forscher haben beobachtet, dafs ein Zusatz von Eiweifsstoffen zu Malzauszügen ihre hydrolytische Kraft erhöht. Dies

Digitized by Google

ist z. B. der Fall mit Hefezellen, die durch Kochen abgetötet wurden, was offenbar auf ihren Gehalt an Eiweifs zurückzuführen ist.

Ein ähnlicher Einflufs ist bei der Speicheldiastase oder dem Ptyalin beobachtet worden. *Chittenden* und *Ely* fanden, dafs Pepton einen bemerkenswerten Einflufs auf die Stärkeverzuckerung ausübt. Bei ihren im Jahre 1881 ausgeführten Versuchen arbeiteten diese Forscher mit 100 ccm Flüssigkeit enthaltend 1 % Stärke, 1 % Pepton und 25 ccm filtrierten Speichel. Bei Vergleichsversuchen wurde das Pepton weggelassen. Die Gemische wurden 45 Minuten bei 40° C. gehalten und dann an der weiteren Verzuckerung durch Aufkochen gehemmt. Dann wurde die Flüssigkeit auf 500 ccm aufgefüllt, filtriert und auf Zuckergehalt untersucht. Bei Gegenwart von Pepton wurden 4 % mehr Stärke verzuckert. Ähnliche Versuche mit Glykogen lieferten dieselben Resultate. Die dem Verzuckerungsprozefs günstigste Menge von Pepton wurde zu 1 % gefunden; eine Vergröfserung des Zusatzes hatte nur geringe oder gar keine Wirkung.

Chittenden und *Ely* fanden ferner, dafs ein Zusatz von 0,25 % Salzsäure zur peptonhaltigen Verzuckerungsflüssigkeit noch vorteilhafter sei; die Menge der verzuckerten Stärke betrug 48 % gegenüber 41 % bei Benutzung von Speichel allein.

Langley und *Eves* haben zwar das Ergebnis in Bezug auf die Wirkung des Peptons mit einer gewissen Einschränkung bestätigt, sie kamen jedoch zu einem entgegengesetzten Resultat, wenn noch Säure zugefügt wurde. Bei ihren Versuchen fanden sie, dafs die günstigste Wirkung mit Pepton erzielt wird mit wesentlich geringeren Zusätzen dieses Eiweifsstoffes; bei einer Verdünnung des Speichels aufs Zehnfache betrug der günstigste Peptonzusatz 0,1 %. Im Gegensatz zu *Chittenden* und *Ely* fanden sie, dafs Pepton in Verbindung mit Salzsäure die Wirkung der Diastase verzögert, und die Verzögerung ist um so gröfser, je mehr sich der Säurezusatz dem Sättigungspunkt des Peptons nähert. *Langley* und *Eves* fanden auch, dafs Myrosin, Alkali-Albumin und Säure-Albumin wie Pepton wirken und dafs Albumin wahrscheinlich die gleiche Wirkung besitzt.

Es wurde oben bereits erwähnt, dafs nach *Baranetzky* kleine Spuren von neutralen Salzen die Wirkung der Malzdiastase er-

Digitized by Google

höhen. *Nasse* konstatierte, dafs dieser Einflufs gewisser Neutralsalze bis zu einer Menge des zugefügten Salzes von 4 % bestehen bleibt. *Chittenden* und *Ely* fanden, dafs ein Zusatz von 0,24 % Kochsalz die Wirkung der Diastase um 6 % und ein Zusatz von 0,3 % Calciumphosphat diese um 3 % erhöht. Ein Zusatz von zweibasischem phosphorsaurem Natron hatte aber andererseits eine Verminderung der diastatischen Wirksamkeit zur Folge.

Osborn und *Campbell* bestätigen ebenfalls die günstige Wirkung des Kochsalzes, wodurch die diastatische Wirkung einer Lösung manchmal um das 7fache erhöht wurde.

Müller hat über die Wirkung der Diastase in den Pflanzenzellen sehr interessante Beobachtungen gemacht. Unter gewöhnlichen Bedingungen enthält der Zellsaft in der Vakuole einer solchen Zelle eine beträchtliche Menge Kohlensäure, entsprechend in manchen Fällen einem Druck von mehreren Atmosphären. Selbst bei gewöhnlichem Druck kann eine Sättigung der Verzuckerungs-Flüssigkeit mit Kohlensäure die Energie der Diastase verdreifachen. Bei Gegenwart von Kohlensäure kann Diastase auf ungekochte Stärke einwirken.

Über den Einflufs von Spuren freier Säure auf die Diastase sind sich die Forscher noch nicht einig. *Baranetzky* behauptete, sie wirkten günstig; seine Ansicht wurde von *Effront* und von *Brown* und *Morris* bestätigt. *Chittenden* und *Griswold* haben festgestellt, dafs das Ptyalin des Speichels sehr energisch bei Gegenwart von 0,05 % Salzsäure wirkt. *Astachewsky* fand, dafs der menschliche Parotidenspeichel manchmal sauer ist, und dafs er dann wirksamer ist als der alkalische Speichel, der zur anderen Zeit gesammelt wurde.

Andererseits haben *Langley* und *Eves* gefunden, dafs die Wirkung neutralisierten Speichels verzögert wurde durch die Gegenwart von freier Salzsäure, so zwar, dafs schon 0,0015 % in dieser Beziehung eine bestimmte Wirkung äufserten, während 0,005 % geradezu hemmend wirkten. Die verzögernde Wirkung wuchs schnell mit dem Prozentgehalt an Säuren.

Wenn die Proteïde des Speichels mit Säure gesättigt wurden, so trat eine Verminderung der diastatischen Wirkung ein, obwohl keine freie Säure zugegen war. Die Verminderung

Digitized by Google

wurde sehr deutlich bei Zusatz der kleinsten Menge freier Säuren.

Chittenden und *Ely* kamen zu demselben Schlufs bezüglich des Einflusses der Salzsäure. Bei Gegenwart von 0,25 % Salzsäure in einem Verzuckerungsgemisch wurden nur 8 % des Zuckers gebildet, der bei einem Parallelversuch ohne Säurezusatz gebildet wurde; *Osborne* und *Campbell* fanden, dafs ein Gleiches der Fall ist bei Anwendung von Citronensäure an Stelle von Salzsäure.

Langley und *Eves* vermuten, dafs die vorteilhafte Wirkung kleiner Spuren Säure (0,005 %), die von *Chittenden* und *Griswold* beobachtet wurde, sich erklären läfst durch die Thatsache, dafs der Speichel gewöhnlich schwach alkalisch ist und die Säure ihn lediglich neutralisieren würde. Speichel verzuckert nach ihnen am besten in vollständig neutraler Lösung. *Chittenden* behauptet jedoch, dafs die Alkalität des Speichels nicht von freien Alkalien, sondern von alkalischen Phosphaten herrührt.

Freie Säure scheint nicht nur hemmend zu wirken, sondern sie zerstört das Enzym. Wenn man Diastase einige Zeit mit Säure in Berührung läfst und diese dann durch Dialyse entfernt, dann hat das Enzym nunmehr kein gröfseres Stärkeverzuckerungsvermögen mehr, als es hätte, wenn man die Säure dem Verzuckerungsgemisch zu Beginn des Verzuckerungsprozesses zugesetzt hätte.

Schwache Alkalien haben ebenfalls einen schädlichen Einflufs auf die Wirkung der Diastase. *Chittenden* und *Ely* fanden, dafs ein Zusatz von 0,6 % Soda die diastatische Kraft des Speichels auf ein Viertel reduziert. Bei einem Zusatz von 0,3 % war die Wirkung nur halb so grofs, bei 0,1 % etwa zwei Drittel der ursprünglichen Stärke.

Langley und *Eves* fanden, dafs 0,0015 % Soda die Wirkung ausgesprochen hemmten. Natronlauge wirkte noch schädlicher als die Soda.

Vergleicht man die Wirkung der Säuren und Alkalien, so kann man feststellen, dafs die Schädigung der diastatischen Kraft des Speichels durch Alkalien eine geringe ist im Vergleich zu der der freien Säuren.

Ein anderer Unterschied ist noch folgender: Wenn auch

Digitized by Google

beide Reagentien die Wirkung der Diastase verzögern, so wirkt doch schwaches Alkali auf das Enzym nicht zerstörend ein. Wenn es durch Dialyse entfernt wird, so erlangt die Diastase annähernd ihre ursprüngliche Wirksamkeit wieder. Soda verhindert also die Wirkung der Diastase, Salzsäure zerstört die Diastase.

Chittenden und *Ely* haben festgestellt, dafs die schädigende Wirkung der Säuren und Laugen durch die gleichzeitige Anwesenheit von Pepton gemildert wird. *Langley* und *Eves* bestreiten dies zwar inbetreff der Säure, für das Alkali bestätigen sie aber diesen Befund. Sie behaupten, der mildernde Einflufs des Peptons mache sich noch bei gröfseren Mengen des alkalischen Salzes bemerkbar.

Brown und *Morris* ermittelten, dafs die Gegenwart von Tannin der Wirkung der Diastase sehr nachteilig sei; dies ist zweifellos von grofser Wichtigkeit, wenn es sich darum handelt, die Diastasemenge in gerbstoffhaltigen Geweben festzustellen. Tannin hindert nicht nur die Wirkung der Diastase, sondern es bildet auch ein grofses Hindernis bei der Extraktion des Enzyms aus den Geweben.

Bereits in einem früheren Kapitel wurde erwähnt, dafs es sehr schwierig sei, die ganze Stärke in Maltose überzuführen. Verschiedene Forscher sind zwar ebenfalls dieser Ansicht, sie stimmen jedoch nicht überein bezüglich des übrig bleibenden Restes. *Musculus* konnte nur 33 % der Stärke verzuckern; *Payen* vermochte 52,7 % zu verzuckern, während *Brown* und *Morris* als gewöhnliches Ergebnis der Stärkeverzuckerung 80 % Maltose und 20 % Dextrin angeben.

Mit fortschreitender Verzuckerung verlangsamt sich der Prozefs immer mehr. Dies ist zweifellos auf eine hemmende Wirkung der Verzuckerungsprodukte zurückzuführen. *Sheridan Lea* hat diese Frage aufgeklärt, indem er die Verzuckerung durchführte einerseits in Flaschen, anderseits in Dialysirröhren, die in einem fliefsenden Wasserstrom aufgehängt waren. Im ersten Falle stellten sich die auch an anderen Forschern beobachteten Verzuckerungsschwierigkeiten ein, im letzteren wurde fast alle Stärke in Zucker verwandelt. *Lea* behauptet, dafs unter diesen Bedingungen der Verzuckerungsprozefs ein intensiverer ist, es wird

Digitized by Google

mehr Stärke in Zucker übergeführt und weniger Dextrin gebildet als wenn unter sonst gleichen Verhältnissen die Verzuckerungsprodukte nicht entfernt werden. *Brown* und *Morris* bestreiten, dafs die Hemmung auf die Gegenwart der Maltose zurückzuführen ist. Sie fanden, dafs ein Zusatz von Maltose zu einem Stärkeverzuckerungsgemisch den Verlauf der Verzuckerung nicht berühre, sondern dafs 80 % der Stärke vollständig verzuckert werden.[1])

Man kann jedoch leicht nachweisen, dafs diese Hemmung der Verzuckerung bei Durchführung des Prozesses in gewöhnlichen Gefäfsen nur eine Verzögerung der Diastasewirkung ist, indem man die Verzuckerungsdauer verlängert. *Brown* und *Morris* teilen einen Versuch mit, bei dem sie die Verzuckerung 20 Tage lang fortführten, wobei die Thätigkeit der Organismen durch Chloroformzusatz verhindert wurde. Nach Verlauf dieser Zeit waren 92,4 % der Stärke in Maltose übergeführt.

Eine andere Thatsache von grofsem Interesse ist die, dafs die Diastase durch fortgesetzte Thätigkeit nicht erschöpft wird. Wir haben gesehen, dafs dies eine allgemeine Eigenschaft der Enzyme ist. Sie wurde zuerst festgestellt von *Foster* im Verlauf einer Untersuchung über die Eigenschaften des Speichels. *Moritz* und *Glendinning* stellten dieselbe Eigenschaft bei der Malzdiastase fest,[2]) von der sie behaupten, dafs sie am Ende des Verzuckerungsprozesses so wirksam sei wie am Anfang, solange die Temperatur bei oder unter dem Verzuckerungs-Optimum liegt. Wird die Verzuckerung bei höherer Temperatur durchgeführt, dann büfst das Enzym an Kraft ein, sie schreiben dies jedoch der Temperatur zu und nicht etwa einer Erschöpfung der Diastase. Bei ihren Versuchen stellten sie folgende interessante Thatsache fest: bei einigen Würzen fanden sie, dafs die Diastase ihre verzuckernde Thätig-

---

[1]) Nach Versuchen von *Grüfs* übte ein Zusatz von 15 % Maltose zu einer Stärkelösung, in der sich Diastase befand, keine hemmende Wirkung aus, weder bei einer kürzeren noch bei einer längeren Einwirkungsdauer, wie dies durch Analysen festgestellt wurde; dagegen läfst sich mittelst der Methode der Jodfärbung durch den Färbungsunterschied erkennen, dafs erst bei einer Konzentration von über 30 % Maltose eine Hemmung allmählich eintritt. *W.*

[2]) Dies geschah schon viel früher durch *Lintner* (Studien über Diastase. Journal für praktische Chemie. Neue Folge. Bd. 36, 1887). *W.*

Digitized by Google

keit einstellte, ehe noch die Umwandlung eine vollständige war. Fügte man jedoch weiter Stärke zu dem Verzuckerungsgemisch, so setzte die Verzuckerung wieder ein, die Diastase stellte jedoch bei demselben Punkte ihre Thätigkeit abermals ein.

Bedingungen der Diastase-Sekretion.

Bei den einfachsten Organismen, die Diastase ausscheiden, z. B. bei den Bakterien und Schimmelpilzen oder unter den höheren Pflanzen bei ganz einfach gebauten Organen, z. B. den Pollenkörnern, kann man feststellen, dafs die Bildung des Enzyms direkt mit der Ernährung des Organismus zusammenhängt. *Lauder Brunton* und *Mac Fadyen* fanden, dafs ein Mikrob beim Züchten auf Stärkekleister Diastase secernierte, dies jedoch bei der Kultur auf Fleischbrühe nicht that. In diesem Falle schied er ein peptonisierendes Enzym aus. *Pfeffer* fand, dafs bei mehreren Schimmelpilzen die Ausscheidung der Diastase von ähnlichen Bedingungen abhängt. Bei den Pollenkörnern verschiedener Pflanzenarten kann man nur dann eine Abscheidung von Diastase beobachten, wenn die Körner Spuren von Zucker aufgenommen haben. Während des Wachsens des Pollenschlauches wird, wie der Verfasser festgestellt hat, die Menge der Diastase ständig vermehrt, wahrscheinlich infolge der zunehmenden Bildung von Nährstoffen, die auf das Plasma des Pollens anregend wirken. Dies kann man besonders gut beobachten bei den Pollen von Lilium. Bei Zamia kann in den ungekeimten Pollenkörnern keine Diastase entdeckt werden; nach erfolgter Aufnahme von Rohrzucker oder Glukose können kleine Mengen Diastase festgestellt werden, noch bevor der Pollenschlauch ausgewachsen ist. Die Sekretion der Diastase ist nicht immer von einer voraufgegangenen Zuckeraufnahme abhängig; bei Lilium bilden sich z. B. beträchtliche Mengen Diastase beim Keimen der Körner in warmem Wasser. Hier kann der notwendige Anreiz für die erhöhte Ausscheidung gesucht werden in der Umwandlung kleiner Mengen Reservestärke, die im ruhenden Korn auch im ungekeimten Zustande vorhanden ist.

Die Ausscheidung der Diastase durch das Schildchen-Epithel der Gräser scheint nicht unter ähnlichen Umständen vor sich zu gehen. Gerstenembryonen, die *Brown* und *Morris* auf Gelatine züchteten, die Stärkekörner enthielt, entwickelten nicht mehr

Digitized by Google

Diastase als ähnliche Embryonen, die auf Gelatine allein kultiviert wurden. In diesem Falle scheint das Kulturmedium nicht von dem Einfluſs zu sein wie bei den bereits erwähnten Mikroorganismen.

Bei einigen anderen Versuchen fanden dieselben Forscher, daſs, während Gerstenembryonen die in Gelatine eingebetteten Stärkekörner angriffen und lösten, andere gleiche Embryonen die Stärke nicht angriffen, wenn der Gelatine eine kleine Menge assimilierbarer Zucker zugesetzt wurde. In diesem Falle blieben die Stärkekörner so lange unangegriffen als noch Zucker vorhanden war. Sobald jedoch der Zucker verschwunden war, wurden sie angegriffen.

Die Verfasser behaupten, daſs in diesen Fällen nicht die Rede sein könne von einer Hemmung der Diastasewirkung durch den Zucker, sondern, daſs bei Gegenwart des letzteren die Epithelzellen des Schildchens thatsächlich keine Diastase ausscheiden. Dies war jedoch nur der Fall bei Kohlenhydraten, die wie der Zucker, für den Embryo direkt assimilierbar waren, während andere, für die Ernährung wertlose Kohlenhydrate, besonders Mannit und Laktose, eine Ausscheidung der Diastase nicht verhinderten.

Nicht nur der vollständige Embryo, sondern auch Schnitte des mit Epithel bedeckten Schildchens wurden durch assimilierbare Kohlenhydrate an der Sekretion der Diastase gehindert.

Die Erscheinung der Diastasesekretion beim Schildchenepithel scheint eine Äuſserung des Hungers zu sein. Solange noch leicht asimilierbare Kohlehydrate vorhanden sind, findet keine Diastaseausscheidung statt, wenn es jedoch an derartigen Substanzen fehlt, wird auf einmal Diastase gebildet.

Bei der Prüfung der Gerste während der Keimung findet man, daſs das Epithelium nicht sofort mit der Diastasesekretion einsetzt. *Petit*, der diese Frage studierte, hat festgestellt, daſs die Diastase erst am vierten Tage in die Erscheinung tritt. Sie erreicht ihr Maximum fast mit einem Male, dann vermindert sie sich wieder bis zum neunten Tage, zu welcher Zeit das Korn nur noch etwa den zwanzigsten Teil der Diastase enthält, die es zur Zeit des Maximums hatte. Diese Thatsache unterstützt die Ansicht von *Brown* und *Morris*, daſs der Anreiz zur Diastase-

Digitized by Google

bildung der Hunger ist. Während der ersten Periode des Keimprozesses ernährt sich der Keimling von den in ihm vorhandenen Kohlenhydraten; seine Bedürfnisse zu dieser Zeit sind gering, und erst wenn das Wachstum flotter vor sich geht, greift er auf die im Endosperm lagernden Reservestoffe über. Nach dem neunten Tage sind diese Reserven ziemlich entleert, und der junge Embryo, der bis dahin seine Wurzeln entwickelt hat, kann nunmehr seine Nahrung von aufserhalb beziehen. *Brown* und *Morris* fanden auch, dafs die Sekretion während der Keimung allmählich zunimmt. Sie weichen von *Petit* jedoch insofern ab, als sie sagen, die stärkste Sekretion werde nicht so früh erreicht. Sie fanden vom vierten bis siebenten Tage eine entschiedene Zunahme der Diastase.

Der Hungerreiz ist auch von *Wortmann* beobachtet worden, der feststellte, dafs ein gewisser Mikroorganismus ein stärkelösendes Enzym ausscheidet, wenn ihm Stärke als einzige Nahrung geboten wird, dafs die Diastasebildung unterbleibt, sobald ihm Zucker oder Weinsäure neben der Stärke geboten wird.

Ein gleiches ist auch noch in Bezug auf andere Enzyme heobachtet worden.

Im Tierkörper hängt die Diastasebildung sehr von Nervenanregungen ab. Die Speicheldrüsen sind in dieser Beziehung am meisten erforscht. Bei den höheren Säugetieren ist jede derselben mit Nerven aus dem cerebro-spinalen und sympathischen System versehen. Eine Reizung eines dieser Nerven ist stets verbunden mit vermehrtem Speichelflufs und vermehrter Bildung des charakteristischen Enzyms. Der Anreiz kann entweder ein direkter oder ein Reflexreiz sein; letzterer kommt hauptsächlich ins Spiel während der normalen Sekretion. Wohlschmeckende Substanzen auf die Zunge gelegt, oder selbst der Speisegeruch, hat stets einen vermehrten Speichelflufs zur Folge. Eine genauere Prüfung dieser Erscheinungen geht jedoch über den Rahmen dieses Buches hinaus. Es genüge, zu sagen, dafs, wenn Speicheldrüsen vor, während und nach der Nervenerregung geprüft werden, die Erscheinungen, die man beobachten kann, zu dem Schlufs berechtigen, dafs ein solcher Nervenreiz Veränderungen in den Speicheldrüsenzellen bewirkt, die auf eine Bildung der festen Bestandteile der Sekretion aus dem Protoplasma der Zelle

Digitized by Google

schliefsen lassen, dafs diese Bestandteile ferner zusammen mit einer gewissen Flüssigkeit, die der Lymphe entstammt, die die Ausscheidungsröhrchen umspült, abgesondert werden.

Der physiologische Zweck der Diastaseausscheidung ist in allen Fällen der Abbau der festen Stärke oder des Glykogens und eine Nutzbarmachung der von den Enzymen gebildeten diffusiblen Produkte für die Ernährung. Dieser Abbau kann aufserhalb der Zelie erfolgen, wie z. B. bei der Sekretion des Speichels, des Pankreassaftes, der Diastase durch das Schildchen-Epithel und gewisser bakterieller Diastasen. Andererseits kann er aber auch intracellular erfolgen, wie z. B. bei der Leber und den gewöhnlichen pflanzlichen Reserven, wie bei den Kartoffelknollen. Die Translokation der Stärke in den Zellen der Laubblätter und anderen grünen Teilen der Pflanzen gehören zu denselben Arten von Erscheinungen. In beiden Fällen handelt es sich um die Ernährung entweder des ganzen Organismus oder der Zellen, in denen sich die Vorgänge abspielen. In den Schutzzellen der Stomata scheint die Umwandlung der Stärke eine andere Bedeutung zu haben. Der Zweck dieser Zellen ist in erster Linie, wenn nicht durchaus, die Regulierung der Atmung oder die Abfuhr von Wasserdampf aus dem Innern der Pflanze. Wenn die Schutzzellen durch Wasseraufnahme geschwollen sind, werden sie konvex und trennen sich ein wenig, wobei die Öffnung zwischen ihnen sich etwas erweitert. Die Arbeit der Stomata hängt also von ihrem Vermögen ab, Wasser aus den Zellen zu absorbieren, an die ihre Schutzzellen anstofsen. Dieses Wasser wird auf dem Wege der Osmose aufgenommen, und der physikalische Prozefs gründet sich auf ihren Gehalt an Stoffen, die Wasser anziehen oder die eine osmotische Affinität besitzen. Die osmotische Affinität der Stärke ist praktisch Null, der Zucker jedoch und die aus diesem gebildeten Säuren besitzen ein beträchtliches Wasseranziehungsvermögen. Die Verzuckerung der Stärke durch Diastase in diesen Zellen führt folgerichtig zur Entwickelung osmotischer Kräfte in denselben, die die Veränderung der Gestalt dieser Zellen bewirken, die im gewöhnlichen Verlauf des Atmungsprozesses in die Erscheinung tritt.

Digitized by Google

Kapitel VI.

Inulase.

Aufser Stärke und Glykogen kommt im Pflanzenreich noch ein anderer Kohlenhydrat-Reservestoff vor, nämlich das Inulin. Es kommt gewöhnlich im Zustand der Lösung im Safte der Zellen vor, aus denen die Reservekammer gebildet wird und kann daraus durch Alkoholzusatz gefällt werden.

Das Inulin hat eine gröfsere Verbreitung, als man bislang annahm. Schon seit langem ist sein Vorkommen in Pflanzen der Compositenfamilie bekannt, hauptsächlich in den Geschlechtern Dahlia, Helianthus, Inula und Atractylis. Diese Pflanzen besitzen entweder Knollen oder knollige bezw. fleischige Wurzeln, und in diesen befinden sich die Inulinlager. Neuerdings hat man gefunden, dafs das Inulin ein sehr gewöhnlicher Reservestoff vieler Monokotyledonen ist; es kommt in reichlicher Menge in vielen der zwiebeligen Liliaceen und Amaryllidaceen und verwandten Pflanzen vor. Hier kann man es sowohl in den Blättern und in anderen Teilen finden, die mit dem vegetativen Stoffwechsel in Beziehung stehen, als auch in den Teilen, die die Reservestoffe aufspeichern, den Zwiebeln, die für diese Pflanzenordnung ja so charakteristisch sind.

Inulin kann man in den Knollen der Artischoke (Helianthus tuberosus) nachweisen, indem man Gewebestücke einige Zeit in Alkohohl einlegt und dann Schnitte des gehärteten Materials in Wasser taucht; hierbei krystallisiert es in Form von Sphärokrystallen aus, die manchmal von beträchtlicher Gröfse sind. Diese Krystalle bestehen aus Nadeln, die symmetrisch so geordnet sind, dafs sie von einem gemeinsamen Mittelpunkte ausgehen. So können sie in einzelnen Zellen auftreten, oder sie können sich durch mehrere Zellen erstrecken und dabei ein verhältnismäfsig

Digitized by Google

grofses Aggregat bilden, das in diesem Falle mit blofsem Auge sichtbar ist. Die fleischigen Wurzeln von Löwenzahn (Taraxacum), Herbstalant (Inula Helenium) liefern bei ähnlicher Behandlung ebenfalls diese Krystalle.

In den Zellen der Gewebe der Zwiebelblätter des Schneeglöckchens (Galanthus) und anderer Amaryllidaceen treten diese Krystallisationen nicht so leicht auf, doch kann das Inulin in amorpher Form nachgewiesen werden.

Das Inulin ist in kaltem Wasser unlöslich; es kann jedoch aus diesen Pflanzen dargestellt werden durch Auskochen der Inulin führenden Gewebe mit grofsen Mengen Wasser und Konzentrieren der so erhaltenen Lösungen. Beim Stehen scheidet es sich als Bodensatz aus. Dieser mufs dann in einer kleinen Menge heifsem Wasser wieder gelöst, durch Kochen mit Tierkohle entfärbt und abermals konzentriert werden; dann scheidet es sich in ziemlich reiner Form allmählich ab. Durch Wiederholung dieser Operation kann es noch weiter gereinigt werden. Zum Schlufs mufs es noch mit kaltem alkoholhaltigem Wasser gewaschen werden.

Das so dargestellte Inulin ist ein weifses Pulver, das leicht in heifsem Wasser löslich ist und beim Abkühlen der Flüssigkeit in Lösung bleibt. Nur sehr wenig löst es sich in kaltem Wasser, gar nicht in Alkohol. Es kann aus seiner wässerigen Lösung durch Alkohol ausgefällt werden; die Ausscheidung beginnt, wenn der Alkoholzusatz 65 % beträgt.

Die Zusammensetzung des Inulins ist, ebenso wie die der Stärke, noch nicht genau erforscht. Gewöhnlich legt man ihm die Formel $C_{12} H_{20} O_{10} . 2 H_2O$ bei. Unter dem Einflufs hydratisierender Agentien, z. B. der Mineralsäuren, geht es in Lävulose über, einen Zucker von einem Links-Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -106^\circ$. Das Inulin selbst besitzt ein spezifisches Drehvermögen $[\alpha]_D = -39{,}9^\circ$.

Inulin kann auch durch Kochen seiner wässerigen Lösung unter Druck oder beim längeren Stehenlassen seiner kalten wässerigen Lösung in Lävulose übergeführt werden, wobei man im letzteren Falle es gegen die Einwirknng der Mikroorganismen schützen mufs.

Bei der Keimung der Knollen oder im Wiederbeginn des Wachstums der fleischigen Wurzeln wird das Inulin durch ein

Digitized by Google

Enzym in Zucker übergeführt, dem man den Namen **Inulase** gegeben hat. Die Existenz dieses Enzyms wurde zuerst im Jahre 1887 von dem Verfasser nachgewiesen gelegentlich einer Untersuchung über die Keimung der Artischokenknolle.

Eine Prüfung der jungen Schöſslinge und der bei der Keimung der Knollen gebildeten Wurzeln ergab, daſs neben dem darin vorkommenden Inulin auch noch eine gröſsere Menge Zucker vorhanden war, als in dem übrigen Teil des Knollens. Der ausgepreſste Saft des Knollens war fast neutral, sehr empfindliches Lackmuspapier zeigte eine schwache Spur Säure an, deren Menge jedoch sicher nicht genügte zur Überführung des Inulins in Zucker.

Man lieſs die Artischokenknollen keimen, bis die entstandenen jungen Pflanzen eine Höhe von 6 Zoll über dem Boden erreicht hatten. Zu dieser Zeit hatte sich das Gewebe des Knollens beträchtlich vermindert; das Innere war schwammig geworden, die Zellen waren fast leer, während sie auf der Auſsenseite und etwas nach innen fest und saftig waren. In diesem Zustand wurden die Knollen fein gemahlen und mit Glycerin extrahiert, worin Inulin unlöslich ist. Nach 24 Stunden wurde das Glycerin abgegossen und unter öfterem Wasserwechsel dialysiert, bis das Dialysat *Fehling*sche Lösung nicht mehr reduzierte.

Eine kleine Menge, etwa 10 ccm, dieses Auszuges wurde dann mit der etwa vierfachen Menge einer einprozentigen Inulinlösung gemischt und in pergamentene Dialysierröhren gebracht, die in 200 ccm destilliertem Wasser aufgehängt wurden, wobei durch einen Thymolzusatz die Wirkung von Bakterien verhindert wurde. Gleichzeitig wurde ein Kontrollversuch angestellt, bei dem der Knollenauszug zur Abtötung eines möglicherweise vorhandenen Enzyms vorher aufgekocht worden war.

Die Dialysate wurden alle 24 Stunden gewechselt und jedesmal auf Zucker geprüft.

In der Röhre, die nicht aufgekochtes Extrakt enthielt, begann allmählich eine Hydrolyse des Inulins, die regelmäſsig mehrere Tage fortschritt, wobei der Unterschied in den Dialysaten der beiden Versuche mit dem Fortschreiten der Hydrolyse immer deutlicher wurde. Das Dialysat des aufgekochten Extraktes enthielt nach ein- bis zweimaligem Wechsel keinen Zucker, während-

Digitized by Google

dessen das Dialysat des ungekochten Auszuges reichliche Kupferreduktionen lieferte.

Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn die Verzuckerung in Glasgefäſsen durchgeführt wurde; auch hier konnte eine andauernde Zuckerbildung beobachtet werden.

Gleichzeitig mit dem Auftreten des Zuckers in den Dialysaten veränderte sich die Menge des Inulins in den Pergamentröhren stetig. Der vom Alkohol aus der Flüssigkeit mit dem unaufgekochten Auszug abgeschiedene Niederschlag wurde immer weniger. Der Kontrollversuch zeigte keine derartige Abnahme des Inulins.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daſs die keimende Artischoke ein Enzym enthielt, durch welches das Inulin in einen reduzierenden Zucker verwandelt wird. Daſs die Zuckerbildung langsam verläuft, ist vielleicht auf die kleine Menge des vorhandenen Enzyms und auf deren Verdünnung beim Extraktionsprozeſs zurückzuführen. In der Artischoke existiert es möglicherweise nur zu einer bestimmten Zeit in den Zellen, deren Inhalt gerade eben hydrolysiert wird; da zur Umwandlung des Inulins einer Knolle mehrere Wochen Zeit nötig sind, so fällt es weiter nicht auf, daſs zu einem gegebenen Augenblick nur kleine Mengen des Enzyms gefunden werden.

Die Inulase kann im ruhenden Knollen nicht nachgewiesen werden; mit Leichtigkeit kann es überhaupt erst nachgewiesen werden, wenn die jungen Triebe zu sprieſsen beginnen, so lange als noch Inulin in den keimenden Knollen zugegen ist.

Während des Wachstums enthalten die jungen Stengel Inulin und zwar im Centrum des Schöſslings, während die umliegenden Teile frei sind. Inulin dialysiert in schwachem Maſse, und zweifellos geht es vermöge dieser Eigenschaft aus der Knolle in den Schöſsling über. Das Inulin hört direkt hinter der wirklich wachsenden Zone auf. In seinem weiteren Verlauf ist es von Zucker begleitet, der nach dem wachsenden Punkt hin stetig zunimmt. Die Verzuckerung durch die Inulase ist daher nicht auf die Knolle beschränkt, obwohl das Inulin dort gebildet wird.

Das Enzym findet sich im wachsenden Schöſsling, wo es mit fortschreitendem Wachstum das Inulin verzuckert.

Das Vorkommen des Inulins an diesen Stellen kann auf

Digitized by Google

andere Ursachen als Dialyse des Reservematerials aus dem Knollen zurückgeführt werden. Man kann es auch mit der Annahme erklären, dafs der Überschufs an Zucker, den die Zellen zum Wachstum nötig haben, zeitweise wieder in Inulin verwandelt wird. Eine solche Rückbildung findet stets bei anderen Pflanzen statt, bei denen die Stärke das Reservematerial bildet.

Bourquelot hat die Inulase in dem Pilz Aspergillus niger im Jahre 1885 aufgefunden. Bei der Kultivierung der Sporen dieses Pilzes fand er, dafs diese in inulinhaltigen Lösungen ebenso flott wuchsen als in solchen, die Rohrzucker oder Glukose enthielten. Damals war das Enzym noch nicht beschrieben, doch im Jahre 1893 war *Bourquelot* im stande, es aus dem Mycel des Pilzes zu isolieren. Aspergillus enthält mehrere Enzyme, doch konnte er unter diesen bestimmt Inulase nachweisen und zwar als bestimmtes Individuum, ebenso wie die Diastase.

Chevastelon hat gezeigt, dafs das Inulin, das aus den bereits erwähnten Gattungen der Monocotyledonen dargestellt werden kann, durch die Inulase des Aspergillus verzuckert werden kann. Er arbeitete hauptsächlich mit dem Inulin des Knoblauchs.

Die Anwesenheit so reichlicher Mengen dieses Kohlenhydrates in den Monokotyledonen läfst vermuten, dafs sie ebenfalls Inulase enthalten. Bis vor kurzem jedoch konnte sie hierin nicht nachgewiesen werden. Kürzlich hat der Verfasser aber nachgewiesen, dafs sie aus den Zwiebeln von *Leucojum* und *Scilla* dargestellt werden kann. Noch leichter kann sie in der keimenden Zwiebel nachgewiesen werden, zur Zeit, wenn die Blumen eben entwickelt, aber noch nicht entfaltet sind. Der Verfasser bediente sich der oben beschriebenen Methode, und das Enzym wies dieselben Eigenschaften wie das der Artischoke auf. Es ist jedoch wegen des in den Zellen vorhandenen Schleimes schwieriger zu extrahieren.

Das Enzym scheint in allen Fällen hauptsächlich, wenn nicht ausschliefslich, auf die Zellen beschränkt zu sein, in denen die Umwandlung des Inulins thatsächlich stattfindet.

Die Wirkung der Inulase läfst sich am besten studieren, wenn man den Verzuckerungsprozefs in Dialysierröhren durchführt. Der Verfasser führte derartige Versuche mehrere Tage lang unter antiseptischen Vorsichtsmafsregeln durch, wobei er

Digitized by Google

die Dialysate alle 24 Stunden wechselte. Die Dialysate der ersten drei Tage wurden verworfen, um sicher zu sein, dafs alles andere aufser Inulin ausschliefslich Produkte der enzymatischen Wirkung sei. Das Volumen der Flüssigkeit war naturgemäfs ein grofses und enthielt nur kleine Mengen von Kohlenhydraten. Die letzten Dialysate wurden gemischt und auf dem Wasserbad bis zur Sirupskonsistenz eingedunstet. Der Sirup enthielt nebeneinander drei Körper, die durch Alkohol von einander getrennt werden konnten. Der erste davon war ein Zucker, der durch Extraktion des Rückstandes mit absolutem Alkohol gewonnen werden konnte. Etwa die Hälfte des Sirups ging in Lösung. Beim Eindunsten der alkoholischen Lösung hinterblieb ein Sirup, der nicht zum Krystallisieren gebracht werden konnte, selbst beim Stehen über konzentrierter Schwefelsäure nicht.

Nach der Entfernung des Zuckers wurde der Rückstand zunächst mit kaltem, dann mit heifsem Wasser behandelt. Ein grofser Teil löste sich im kalten Wasser, was schliefsen liefs, dafs dieser Teil kein Inulin war, da dieses nur in heifsem Wasser löslich ist. Dagegen bestand der in kaltem Wasser unlösliche, in heifsem aber lösliche Rückstand aus Inulin, das, da es in geringem Mafse dialysierfähig ist, durch die Membran während der letzten Stadien des Verzuckerungsprozesses hindurchdiffundierte.

Die beiden Lösungen wurden gemischt und allmählich mit Alkohol versetzt. Als der Alkoholgehalt 65 % erreicht hatte, schied sich das Inulin als krystallinischer Niederschlag ab. Dieser wurde abfiltriert und zum Filtrat mehr Alkohol zugesetzt. Bei einem Alkoholgehalt von 82 % wurde die Flüssigkeit schleierig und allmählich schied sich ein sehr feinkörniger Niederschlag aus. In 100 Teilen des Rückstandes waren etwa 62,5 Teile unverändertes Inulin und 37,5 Teile des zweiten Körpers, der ein Verzuckerungszwischenprodukt zu sein schien.

Beim Eindampfen der wässerigen Lösung dieses Körpers schied sich eine krystallinische Substanz ab. Die Krystalle unterscheiden sich wesentlich von den Sphärokrystallen des Inulins; im allgemeinen hatten sie das Aussehen von Platten, manchmal pentagonal, manchmal rhomboedrisch oder oblong; hier und da fanden sich nadelförmige Prismen, die rosettenförmig angeordnet waren.

Digitized by Google

Bei der Prüfung mehrerer Handelsproben sogenannten Inulins konnte festgestellt werden, dafs diese wechselnde Mengen dieses Zwischenproduktes enthielten. Es kann vom Inulin durch fraktionierte Fällung mit Alkohol getrennt werden, weniger leicht durch Dialyse. Es dialysiert leichter als Inulin; eine Probe des Handelsinulins enthielt 12—14 % dieses Produktes, wie durch die Fällungsmethode festgestellt wurde; nach einer fünftägigen Dialyse enthielt das Dialysat beide Körper, doch machte der Zwischenkörper 66 % des Gesamtniederschlages aus, der durch Alkohol ausgefällt wurde.

Dieses Zwischenprodukt unterscheidet sich vom Inulin in folgenden Einzelheiten:

1. Es ist leichter löslich in kaltem Wasser.
2. Es dialysiert leichter.
3. Es hat eine andere Krystallform.
4. Es ist in Alkohol von 65 % löslich und wird erst von mindestens 82prozentigem Alkohol gefällt.

Da der Verfasser die ersten Dialysate verworfen hatte, die also das im Handelsinulin vorkommende Zwischenprodukt enthielten, so nimmt er an, dafs das in den letzten Dialysaten gefundene Produkt auf eine Neubildung aus Inulin unter der Einwirkung der Inulase zurückzuführen sei. Das ganze im Inulin enthaltene Zwischenprodukt mufste in den ersten Dialysaten sein, da es im Vergleich zum Inulin aufserordentlich leicht dialysierfähig ist. Seine Bildung unter dem Einflufs des Inulaseenzyms erinnert lebhaft an die Bildung des Dextrins aus Stärke unter Einwirkung der Diastase. Es ähnelt auch dem Dextrin etwas in Bezug auf sein Verhalten gegen Alkohol, da es in stärkerem Alkohol löslicher ist als das ursprüngliche Kohlehydrat, in 82prozentigem Alkohol aber unlöslich ist, durch den auch das Dextrin ausgefällt wird.

Der gebildete Zucker ist von *Bourquelot* untersucht worden. Dieser versetzte 1,32prozentige Inulinlösungen mit Inulase und liefs bei Zimmertemperatur bis zur vollkommenen Verzuckerung stehen. Während des Verzuckerungsprozesses wurde die Flüssigkeit polarimetrisch von Zeit zu Zeit untersucht unter Berücksichtigung der Temperatur der Flüssigkeit.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Digitized by Google

Verzuckerungs-Dauer Stunden	Beobachtete Drehung	Temperatur der Flüssigkeit Grad C.	Prozente Zucker berechnet aus der Drehung
—	— 1,06	17	0
12	— 2,03	17	0,871
36	— 2,43	17,5	1,283
64	— 2,50	19	1,371
84	— 2,53	19,5	1,403

Das benutzte Inulin hatte eine Drehung $[\alpha]_D = -39,9$.

Aus diesen Versuchen schliefst *Bourquelot:*

1. dafs das in Arbeit genommene Inulin fast vollständig in Zucker übergeführt wurde,
2. dafs unter Berücksichtigung des Einflusses der Temperatur auf die Drehung der Lävulose, die zuletzt beobachtete Drehung fast genau der einer gleichprozentigen Lävuloselösung entsprach.

Es scheint hiernach, als werde unter der Einwirkung der Inulase das Inulin (im vorliegenden Falle aus Atractylis gewonnen) fast ganz in Lävulose übergeführt.

Bourquelot macht noch auf eine weitere interessante Thatsache aufmerksam. Wenn man zu einer Inulinlösung Inulase giebt, so erregt Hefe in dem Gemisch alkoholische Gärung. Nur unterliegt das Inulin nicht der alkoholischen Gärung, während Lävulose leicht gärt.

Inulase findet sich im ruhenden Knollen der Artischoke nicht, wie bereits oben erwähnt wurde. Sie kann jedoch bereits vor dem Beginn der Keimung aus diesen Knollen dargestellt werden. Wenn diese nämlich zerkleinert und bei einer Temperatur von 35° C. 24 Stunden stehen gelassen werden, so weist ein Auszug daraus das Vermögen auf, Inulin zu verzuckern. Ohne vorherige Erwärmung ist ein solcher Auszug gänzlich unwirksam. Die Inulase scheint in solchen Knollen in der Form eines Zymogens vorhanden zu sein.

Inulase ist auf Stärke ohne Einwirkung; sie kommt jedoch in einigen Pflanzen von gleicher Art vor wie die Diastase, mit der sie in diesen Fällen leicht verwechselt werden kann. Im Aspergillus kommt sie neben mehreren anderen Enzymen vor; mit einem derselben, der Trehelase, kann sie leicht verwechselt

Digitized by Google

werden. Sie kann jedoch von diesem Enzym unterschieden werden durch die Temperatur, bei der beide zerstört werden.

Die Inulase arbeitet am besten in einer neutralen oder sehr schwach sauren Flüssigkeit, am besten in 0,001prozentiger salzsaurer Lösung. Stärkere Säuren wirken schädlich; eine einstündige Einwirkung von 0,2prozentiger Salzsäure bei 40° C. zerstört sie gänzlich. Alkalien sind ebenfalls schädlich; die einstündige Einwirkung einer 1,5prozentigen Sodalösung zerstört sie vollständig. Die Schnelligkeit, mit der das Enzym durch Säuren zerstört wird, ist abhängig von der Temperatur, die während der Einwirkung herrscht. Bei niedriger Temperatur wird das Enzym bedeutend weniger geschwächt als bei 40° C., aber nach einstündiger Einwirkung bei 10—15° C. ist seine verzuckernde Kraft bereits sehr geschwächt.

Die Energie der Inulase ist abhängig von der Temperatur; bei 40° C. ist sie viel wirksamer als bei gewöhnlicher Temperatur. Sie übersteht eine Temperatur von 64° C., die die Trehelase zerstört; die Inulase wird erst bei 70—75° C. unwirksam.

Digitized by Google

Kapitel VII.

Cytase und andere Cellulose lösende Enzyme.

Bei den Samen vieler Pflanzen, hauptsächlich unter den Monokodyledonen, finden sich die Kohlenhydrat-Reservestoffe, die zur Ernährung des Keimlings während der Keimung dienen, in der Form aufserordentlich verdickter Zellwände, hauptsächlich des Endosperms, in welche das junge Pflänzchen eingebettet ist. In anderen Fällen dienen Zellwände von verhältnismäfsig geringer Dicke dem gleichen Zweck, jedoch in geringerem Umfange, wie man bei der Gerste und anderen Gräsern sehen kann. Während des Keimprozesses werden diese Zellwände gelöst und verschwinden, wobei sie Veränderungen erleiden, die denen der Stärke insofern ähneln, als dabei schliefslich Zucker gebildet wird. Gewöhnlich hat man diese Zellwände für Cellulose gehalten, neuere Untersuchungen haben jedoch ergeben, dafs sie von komplexerer Zusammensetzung sind.

Die Zusammensetzung der Zellwände wechselt mit den einzelnen Pflanzen sehr, sogar in den verschiedenen Teilen derselben Pflanze. Aufser der Cellulose enthalten sie Körper, die unter dem Namen Pektosen bekannt sind, die mehrere sehr komplexe Substanzen in sich begreifen. Den Namen Cellulose wendet man jetzt an zur Bezeichnung einer sehr grofsen Klasse von Pflanzenbestandteilen, deren Glieder beträchtliche Unterschiede in den Eigenschaften und in der Leichtigkeit, mit der sie sich zersetzen, aufweisen. Die stufenweise Nutzbarmachung der Zellwände verschiedener Endosperme bringt sehr tiefgreifende Veränderungen mit sich, sowohl was die Cellulosen, als auch was die Pektosen anlangt.

Die Cellulose-Verbindungen zerfallen nach *Cross* und *Bevan* in drei bestimmte Klassen:

Digitized by Google

1. Solche, die der Hydrolyse sehr grofsen Widerstand entgegensetzen und die in ihrem Molekül keine direkt aktive CO-Gruppe enthalten. Diese werden durch die Cellulose der Leinwandfaser repräsentiert.

2. Solche, die der Hydrolyse einen weniger grofsen Widerstand entgegensetzen und aktive CO-Gruppen enthalten. Diese betrachtet man wohl am besten als Oxycellulosen. Sie scheinen die Hauptmasse des Grundgewebes der blühenden Pflanzen auszumachen; sie kommen in Verbindung mit dem Lignin in den Wänden der Holzzellen vor.

3. Solche, die verhältnismäfsig leicht hydrolisiert werden, die mehr oder weniger leicht löslich sind in Alkalien und leicht von Säuren zersetzt werden, wobei sie in Kohlenhydrate von niedrigerem Molekulargewicht übergehen. Unter diesen befindet sich die Cellulose der Wände der Samenzellen.

Die einzelnen Glieder dieser drei Gruppen verhalten sich gegen hydrolysierende Agentien sehr verschieden, und die Endprodukte der Zersetzungen, die sie erleiden, sind untereinander ebenfalls sehr verschieden.[1])

Die Pektosegruppe aus den Bestandteilen der Zellwand ist von vielen Forschern untersucht worden, u. a. von *Payen, Vauquelin, Mulder, Fremy, Kutsch, Vogl* und *Wiesner*.

Die neuesten Beobachtungen hat *Mangin* angestellt, der am ausführlichsten über ihre Eigenschaften und Reaktionen berichtet hat. Nach ihm zerfallen sie in zwei Gruppen; zur einen gehören Körper von neutraler Reaktion, während die anderen schwache

[1]) Nach *E. Schulze* werden diejenigen Cellulosen, welche von verdünnten Säuren leicht angegriffen werden, Hemicellulosen genannt; sie werden als Anhydrite derjenigen Zuckerarten aufgefafst, welche aus ihnen bei der Hydrolyse entstehen. So würde z. B. das Mannan aus den verdickten Zellwänden des Dattelendosperms Mannose, das Galaktan aus den Zellwänden der Lupine Galaktose, das Araban aus gewissen Zellhäuten Arabinose u. s. w. liefern. Alle diese Cellulosen werden von dem Enzym der keimenden Gerste angegriffen. Dringt dasselbe dabei in die betreffende Zellwand ein, so zeigt die hydrolysierte Membran nach *Grüfs* ganz allgemein folgende Eigenschaften: Die Lichtbrechung ist schwächer (die Cellulose ist hyalin), die Doppelbrechung im polarisierten Licht ist herabgesetzt, das Speicherungsvermögen für Farbstoffe hat sich geändert und ebenso das Verhalten gegen Jodreagentien (beim Mannan Jod-Phosphorsäure) und die Löslichkeit bei Zusatz von Säuren ist gröfser geworden. *Windisch.*


Digitized by Google

Säuren sind. Jeder Gruppe gehören wahrscheinlich mehrere Glieder an, die untereinander jedes Stadium physikalischer Beschaffenheit, von absoluter Unlöslichkeit bis vollkommener Löslichkeit im Wasser, zeigen; die dazwischen liegenden Körper zeigen gelatinöse Beschaffenheit, charakterisiert durch das Vermögen, Wasser in kleinerem oder gröfserem Mafsstabe zu absorbieren.

In den neutralen Gruppen werden die äufsersten Glieder repräsentiert durch die Pektose und die Pektine. Erstere ist unlöslich in Wasser und vergesellschaftet mit der Cellulose in der Substanz der Zellmembranen; letztere ist löslich in Wasser und bildet mehr oder weniger leicht eine Gallerte. In der anderen Gruppe sind die hauptsächlichsten Vertreter die Pektinsäure und die Metapektinsäure. Erstere existiert in den Zellmembranen in Verbindung mit den Metallen der alkalischen Erden, insbesondere Calcium; in freiem Zustand ist sie in Wasser unlöslich. Metapektinsäure ist in Wasser löslich, bildet jedoch keine Gallerte.

Die beiden Gruppen stehen in engen Beziehungen zu einander, denn die zahlreichen Glieder der beiden Gruppen können aus Pektose durch die Einwirkung von Hitze, Säuren und Alkalien erhalten werden. Das Endprodukt der Einwirkung dieser Reagentien ist die leichtlösliche Metapektinsäure.

Mangin beschreibt ihre charakteristischen Eigenschaften wie folgt:

Pektose. Die wirklichen Eigenschaften dieser Substanz sind nicht leicht zu bestimmen; man kennt sie auch noch ganz und gar nicht gut. Sie ist so eng mit der Cellulose vergesellschaftet, dafs man sie noch nicht rein hat darstellen können. Die Reagentien, die sie von der Cellulose trennen, verwandeln sie entweder in Pektin oder in Pektinsäure, wovon ersteres im Wasser, letztere in Alkalien löslich ist. Man kann zeigen, dafs die Zellwand beide Bestandteile enthält, indem man sie mit *Schweizers* Reagens (schwefelsaurem Kupfer-Ammoniak) behandelt; unter geeigneten Vorsichtsmafsregeln löst dieses die Cellulose und läfst dabei das Gerüst der Zelle scheinbar unverändert; diese besteht aber dann nicht aus reiner Pektose, sondern aus einer Verbindung von Pektinsäure mit dem Kupfer des Reagenses.

Digitized by Google

Pektin. Dieser Körper schwillt auf und löst sich in Wasser und bildet damit eine zähe Flüssigkeit, die bald zur Gallerte erstarrt. Er kommt in beträchtlichen Mengen in vielen reifen Früchten und in einigen Schleimen vor. Er giebt mit neutralem Bleiacetat keine Fällung, wird jedoch von dem basischen Acetat in weifsen Flocken ausgefällt. Beim mehrstündigen Kochen mit Wasser geht das Pektin in einen isomeren Körper, das Parapektin, über, das von neutralem Bleiacetat gefällt wird. Weiteres Kochen mit verdünnten Säuren verwandelt es in Metapektin, das von Chlorbaryum gefällt wird.

Pektinsäure. Dieser Körper ist in Wasser, Alkohol und Säuren unlöslich. Er bildet mit Alkalien lösliche und mit den Metallen der alkalischen Erden unlösliche Pektate, von denen das Calciumpektat am verbreitetsten ist. Es löst sich in alkalischen Salzlösungen, z. B. in Soda- und Pottaschelösungen, in zinnsauren Salzlösungen, alkalischen Phosphatlösungen und den meisten Lösungen organischer Ammoniaksalze, wobei sich Doppelsalze bilden, die mehr oder weniger leicht mit Wasser gelatinieren. Seine Lösung in alkalischen Karbonaten ist schleimig, in oxalsaurem Ammoniak ist es jedoch vollständig klar löslich.

Metapektinsäure. Dieser Körper besitzt saure Reaktion, ist leicht löslich in Wasser und bildet mit allen Basen lösliche Salze, hauptsächlich mit denen des Calciums und Baryums, welche Pektinsäure fällen. Metapektate färben sich beim Erhitzen mit überschüssigem Alkali gelb. Die Metapektinsäure und ihre Verbindungen nähern sich in ihrer Zusammensetzung den Gummisubstanzen. Läfst man verdünnte Schwefelsäure darauf einwirken, so spaltet sie sich in einen rechtsdrehenden krystallisierbaren Zucker, scheinbar identisch mit Arabinose, und in eine wenig bekannte organische Säure. Hierin erinnert die Metapektinsäure etwas an die Gruppe der Glukoside.

Die Cellulose- und Pektose-Bestandteile der Zellwand zeigen ein ganz verschiedenes Verhalten. Erstere sind in *Schweizers* Reagens löslich, letztere sind darin unlöslich. Bei der Oxydation mit Salpetersäure liefert erstere Oxalsäure, letztere Schleimsäure. Die partiell hydratierten Cellulosen färben sich mit Jod blau, während sich die Pektosen damit nicht färben. Sie verhalten sich auch verschieden gegen Färbemittel, sowie gegen verdünnte

Digitized by Google

Säuren und Alkalien. Nach *Tollens* und *Gans* ist der bei der Hydrolyse der Cellulose mit verdünnter Schwefelsäure gebildete Zucker eine rechtsdrehende Mannose.

Unter der Einwirkung starker Säuren und anderer hydratisierender Agentien schwillt eine verdickte Zellwand, die sich noch nicht verholzt oder verkorkt hat, stark auf und zeigt Spuren von Schichtenbildung. Die aufeinanderfolgenden Schichten entsprechen den Lagen verdickender Substanz, die auf der ursprünglichen Substanz abgelagert worden sind. Jede Lage enthält ein Gemenge der beschriebenen Substanzen; sie unterscheiden sich etwas von einander in Bezug auf die Mengenverhältnisse ihrer Bestandteile.

Zwischen den aneinanderstehenden verdickten Zellwänden erscheint oft eine sehr deutliche Schicht, bekannt als Mittellamelle. Diese kann auch, wenn auch schwierig, in unverdickten Zellmembranen beobachtet werden. Sie giebt charakteristische Reaktionen, die darthun, dafs sie wesentlich von dem übrigen Teil der Zellwand sich unterscheidet. Ihre Zusammensetzung wird in einem späteren Kapitel besprochen.

Cytase.

Die Zusammensetzung der Zellwände, die schliefslich als Nahrung für den jungen Keimling während der Keimung des Samens dienen, ist aufserordentlich kompliziert, und ihre Abbauprodukte können nicht so leicht wie die der Stärke bestimmt werden. Während der Keimung wird dieser Abbau bewirkt durch die Wirkung eines Enzyms, das man Cytase genannt hat; inwieweit dies jedoch ein einzelnes Enzym ist und welche Substanzen es angreift, kann zur Zeit noch nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Ein ähnliches, wenn nicht dasselbe Enzym ist in gewissen Pilzen entdeckt worden. Möglicherweise haben wir mehrere solcher Enzyme, vielleicht auch nur eines.

Von der Cytase hat man viele Jahre nichts gewufst; wir kennen sie erst seit 1886, in welchem Jahre sie von *de Bary* entdeckt wurde. Bei seinen Untersuchungen über die Lebensgeschichte eines besonderen Pilzes, Peziza sclerotiorium, fand er, dafs dieser, obwohl normalerweise ein Saprophyt, unter gewissen Bedingungen zum Parasiten werden konnte, und dafs er dann

Digitized by Google

häufig die Behälter der Reservestoffe angriff, z. B. die Wurzeln der Karotten und Runkelrüben. Nach seinem Verhalten schien er saprophytisch zu leben, obwohl er das lebende Gewebe anfällt. Seine Hyphen oder einige derselben schieden eine Substanz aus, die die Zellen vergiftete, wobei die letzteren dann die Brutstätte abgaben, in der die Hyphen sich verbreiteten und vermehrten. Bei ihren Angriffen auf lebende Gewebe bildete diese Peziza dichte Massen von Mycelien im Inneren der Wurzeln, wobei diese so weich wurden, als wären sie gekocht worden. Aufser dafs sie Reservelager, wie die Wurzeln angriff, konnte sie auch die Stämme der lebenden Pflanzen befallen, wobei deren Substanz ebenfalls weich wurde. Die mikroskopische Prüfung zeigte, dafs die Hyphen hauptsächlich zwischen die Zellen wuchsen, wobei die Mittellamelle zerstört und die Zellwände in eine halbschleimige Masse verwandelt wurden. Beim Studium der Askosporenkulturen dieses Pilzes beobachtete *de Bary*, dafs jede Spore ein Mycel verzweigter Hyphen bildete und dafs diese wiederum merkwürdige Anhängsel bildeten, die sich aus verzweigten Hyphen zusammensetzten, die die Gestalt einer Art Quaste annehmen und gegebenenfalles die Fähigkeit erlangten, durch Cellulose hindurchzudringen. Wurde die Kultur auf einem jungen Samengewächs gemacht, wobei sich Petunia violacea besonders angriffsfähig zeigte, so töteten diese Anhängsel-Organe schliefslich einige Zellen der Epidermis und ermöglichten ein Eindringen in die darunter liegenden Gewebe, in die sich die Hyphen darauf verzweigten. Die Zellen in der Nachbarschaft der Hyphen wurden eigentümlich angegriffen, indem sie ihr Wasser verloren und zusammenbrachen. Die Zerstörung schien durch ein von den Hyphen ausgeschiedenes Sekret bewirkt zu werden und die Bedingungen für ein späteres Wachstum zu schaffen.

De Bary untersuchte alsdann die Gewebe, die von diesem Sekret angegriffen wurden; er drückte den Saft aus ihnen aus und fand, dafs Stücke der Internodien des Stengels der Bohne oder Teile frischer Karotten oder Kohlpflänzchen beim Einlegen in diesen Saft sehr rasch zerstört wurden, wobei die Zellen unter Anschwellung ihrer Wände plasmolysierten, während später die Mittellamellen gelöst wurden.

In dem Safte, der aus der Karotte nach dem Angriff des

Digitized by Google

Pilzes ausgepreſst wurde, entdeckte *de Bary* eine Substanz, die die Fähigkeit besaſs, die Zellwände zum Anschwellen zu bringen und einen gewissen Teil derselben zu lösen. Beim Aufkochen verlor der Saft diese Fähigkeit. Die Flüssigkeit, die die Eigentümlichkeit besaſs, die Zellwände zu lösen, konnte auch aus den Sklerotien der Peziza ausgepreſst werden, so daſs die in Frage stehende Substanz eine Sekretion des Pilzes und nicht ein Produkt war, das bei der Zerstörung des Gewebes seiner Wirtspflanze gebildet wurde. Diese Substanz war das Enzym, von dem das laufende Kapitel handelt, welchem von späteren Forschern der Name Cytase beigelegt wurde.

Im Jahre 1888 wurde dieses Enzym durch *Marshall Ward* in einem Pilz entdeckt, der zum Genus Botrytis gehört, der gewisse Lilien, insbesondere Lilium candidum zerstört und der viel Ähnlichkeit mit dem von *de Bary* studierten Pilz hat. Die keimenden Sporen dieser Botrytis können im hängenden Tropfen in der Hohlkammer sehr leicht unter dem Mikroskop beobachtet werden. Die Sporen treiben Hyphen aus, die sich zu einem Mycelium entwickeln, das sich durch die Kulturflüssigkeit verzweigt. Aus diesem wachsen rechtwinkelig zur Masse des Myceliums kurze Äste aus nach der unteren Seite des Deckglases zu. Sobald ein Zweig mit dem Glas in Berührung kommt, schwillt er auf und wird weich; seine äuſseren Umrisse umgeben sich mit einem eiweiſsartigen Häutchen, das aus den verflüssigten Bestandteilen der Zellwand entstanden ist. In vielen Fällen verzweigen sich diese kurzen senkrechten Äste, entweder am äuſsersten Ende oder weiter hinten. In einigen Fällen wachsen Äste aus dem Mycel von der Oberfläche des hängenden Tropfens gegen die Höhlung der feuchten Kammer, und wenn sie mit den Wänden derselben in Berührung kommen, heften sie sich in oben beschriebener Weise ans Glas. Diese Heftorgane gleichen in vieler Beziehung den von *de Bary* beschriebenen.

Häufig kann man beobachten, daſs, wenn die Hyphen sich nicht anheften, ihre Spitzen kleine Tropfen einer durchscheinenden mehr oder weniger zähen Flüssigkeit ausschwitzen, die eine groſse Anzahl kleiner, glänzender Körnchen enthält, wobei das Protoplasma der Hyphen auſserordentlich reich an Vakuolen wird. Die Ausschwitzung hält einige Stunden an, der Tropfen wird immer

Digitized by Google

körniger, seine Farbe geht in ein blasses Braungelb über. Bei der mikrochemischen Prüfung der Tropfen scheinen sie gewisse Mengen Eiweifs zu enthalten, woraus in Verbindung mit der Vakuolenbildung zu schliefsen wäre, dafs sie entweder aus Plasma selbst oder aus einem Abbauprodukt desselben bestehen.

Diese Tropfen enthalten das Enzym Cytase, welches hiernach als ein Sekret des Protoplasmas der Hyphen erscheint. Die oben beschriebenen Körnchen findet man vergesellschaftet mit der Bildung von Enzymen in anderen Fällen. Das Sekret ist nicht das reine Enzym; es ist ein zusammengesetzter Körper, der verschiedene Eiweifsstoffe enthält. Es giebt zwei Gründe zur Annahme, dafs das Enzym in den Tropfen enthalten ist. Die Spitzen der Hyphen, die die Tropfen ausschwitzen, dringen in und durch die Zellwand dünner Schnitte parenchymatischer Gewebe. Ferner bringt ein wässeriger Auszug aus einer solchen Hyphenmasse unveränderte Zellwände zum Schwellen, wenn dünne Parenchymschnitte in Tropfen des Auszuges eingelegt werden.

Die Lokalisation des Enzyms in den Spitzen der Hyphen führt zu der Annahme, dafs das Weichwerden dieser Hyphen bei der Berührung mit dem Deckglas oder der Wand der feuchten Kammer ebenfalls auf die Wirkung des Enzymes zurückzuführen sei, dafs nämlich die verflüssigte Substanz, die, wie oben beschrieben, die Spitzen der anhaftenden Äste umgiebt, umgewandelte Cellulose sei, die zum Zweck des besseren Anheftens schleimig geworden ist.

Die Wirkung der Cytase kann auch beim Wachstums- und Verzweigungsprozefs der Hyphen beobachtet werden. Das Enzym wird hauptsächlich an oder in der Nähe der Fäden ausgeschieden; wenn es sich dort anhäuft, erweicht es die Zellwand entweder an der Spitze oder in deren Nähe und ermöglicht dadurch dem hydrostatischen Druck in der Hyphe einen neuen Ast zu treiben oder das Spitzenwachstum des ursprünglichen Fadens fortzusetzen.

Wenn man das Mycel auf der Oberfläche eines Gewebstückes, z. B. eines Blattes oder einer Lilienknospe, wachsen läfst, so übt die Berührung der senkrechten Äste mit der Epidermis des Gewebes einen Reiz aus, auf den der Pilz durch Ausscheidung des Enzyms antwortet. Dieses wird alsdann von den Spitzen in

Digitized by Google

oben beschriebener Weise entbunden, es heftet jedoch die Hyphen nicht an die Epidermis, wie an das Deckglas. Im Gegenteil erweicht es die Wände des Gewebes und macht unter langsamer Auflösung der Cellulose den Hyphen den Weg ins Innere frei; fortwährende Neubildung und Ausscheidung das Enzyms ermöglicht es dem Mycel, sich auf Kosten der Zellwände zu entwickeln, die nun der Wirt des Parasiten geworden sind, zusammen mit den Nährstoffen der Zellen selbst.

Es ist bei diesem Pilz interessant, zu beobachten, dafs der Anreiz, den die Berührung mit einem lebenden Blatt bewirkt, Anlafs ist zu einer vermehrten Bildung des Enzyms. Die Sekretion scheint hauptsächlich eine Hungererscheinung zu sein; der Pilz benutzt die Gegenwart von Nährstoffen der ihn berührenden Substanz und bemüht sich, sich diese anzueignen. Wenn man zu einer unter dem Mikroskop durchgeführten Kultur frische lösliche Nährstoffe giebt, wenn das Mycel bereits begonnen hat, Stücke des Pflanzengewebes durch Ausschwitzung jener Tropfen anzugreifen, so hört die Bildung und Ausschwitzung der letzteren sofort auf, und das Mycel wächst und verzweigt sich auf Kosten des neuen zugefügten Nährmaterials. Wenn dieser Vorrat erschöpft ist, beginnt die Tropfenbildung aufs neue und das in der Kulturflüssigkeit befindliche Gewebe wird wieder angegriffen.

Die Cytase greift nicht alle Teile der Zellwand mit gleicher Leichtigkeit an; obwohl sie die äufseren Schichten der Oberhautzellen erreicht und quer durch die Wände des darunter liegenden Parenchyms geht, so ergiefst sie sich häufig in der Ebene der Mittellamelle zwischen den Zellen. Die Zusammensetzung dieser drei Modifikationen der Zellwand wechselt sehr, und man weifs nicht genau, welche chemische Umwandlungen Platz greifen. Hierüber soll noch später gesprochen werden.

Oben wurde gesagt, dafs ein wässeriger Auszug eines aktiven Mycels die Fähigkeit besitzt, die Zellwände eines in den Auszug gelegten Gewebes zum Schwellen zu bringen. Das Enzym kann so aus dem Pilz auf künstliche Weise extrahiert werden; es wird aufserdem noch von dem Mycel in die Nährflüssigkeit abgeschieden, in der letzteres kultiviert wird. Wenn das Kulturmedium oder der ausgeprefste Extrakt aufgekocht wird, so verliert er seine zellstofflösende Kraft, die Cytase ist gestört. Diese

Digitized by Google

Zerstörung der Wirksamkeit durch Erhitzen kann in der That als ein Beweis dafür angesehen werden, dafs die Wirkung thatsächlich auf ein Enzym zurückzuführen ist. Wenn man eine dicke Zellwand mit Cytase behandelt, so zeigt die mikroskopische Prüfung, dafs die Wirkung des Enzymes der verdünnter Mineralsäuren ähnlich ist; die aufeinander folgenden Schichten der Zellwand werden sichtbar, jede einzelne Schicht schwillt an und löst sich schliefslich.

Man kann aus den oben beschriebenen Kulturen Cytase darstellen, wenn man das Mycel mit Sand zerreibt und die Flüssigkeit aus dem erhaltenen Brei abprefst. Dann filtriert man und giefst das Filtrat in einen grofsen Überschufs von Alkohol, wobei ein flockiger, teils amorpher, teils krystallinischer Niederschlag ausfällt. In diesem Zustand ist das Enzym sehr unrein, mit noch mehreren andern Körpern gemischt. Eine Lösung des Niederschlags in Wasser besitzt die Eigenschaften der ursprünglichen Flüssigkeit und löst Zellwände mit Leichtigkeit. Die Mittellamellen zwischen den Zellen eines Gewebestückes verschwinden dabei zuerst; die Zellen trennen sich und ihre Wände zeigen deutliche Schichtenbildung und Schwellung.

Aus diesen Beobachtungen von *de Bary* und *Marshall Ward* ergiebt sich, dafs die Cytase von Pilzen ausgeschieden wird und bei deren Entwickelung und Ernährung eine wichtige Rolle spielt. Neuerdings sind ihre Ergebnisse von *Kean* bestätigt worden, der eine Art Cytase aus Rhizopus nigricans dargestellt hat. In welchem Teile des Pilzes sie ihren Sitz hat, wurde noch nicht festgestellt, auch wurde über ihre Wirkungsweise noch weiter nichts mitgeteilt, als dafs sie imstande ist, Cellulose-Zellwände zu erweichen. Bei der Kultur dieses Pilzes in Gelatine beobachtete *Arthur*, dafs hier und dort an den Seiten der Hyphen eine Ausschwitzung von Tropfen stattfand, ähnlich der von *Wards* Botrytis und dafs ferner Hyphenzweige an den Stellen entspringen, wo die Tropfen beobachtet worden waren. Dies ist in gewissem Mafse eine Bestätigung von *Keans* Beobachtung.

Cytase ist in den höheren Pflanzen entdeckt worden, soweit jedoch bekannt, hat sie nicht die weite Verbreitung der Diastase. Ihre Entdeckung verdanken wir hauptsächlich den Untersuchungen von *Horace T. Brown*, zum Teil unternommen mit *Morris* und *Escombe*.

Digitized by Google

Die ersten Untersuchungen, die hier besprochen werden sollen, wurden unternommen von *Brown* und *Morris* gelegentlich einer Studie über den Keimprozefs der Gerste und anderer Getreidearten. Diese Untersuchung führte bekanntlich zur Entdeckung der Sekretion der Diastase durch das Epithel des Schildchens. Es wurde bereits erwähnt, dafs sowohl Cytase, als auch Diastase in der von diesen Zellen gebildeten und ausgeschiedenen Substanz vorhanden ist, wenn auch nicht soviel wie in der von der Aleuronschicht gebildeten.

Brown und *Morris* haben genau die Veränderungen beschrieben, die man in dem Endosperm direkt unter dem Schildchen beobachten kann. Zwischen den stärkeführenden Zellen des Endosperms und dem Schildchenepithel befindet sich eine verhältnismäfsig dicke Schicht von leeren und zusammengeprefsten Zellen, die ein etwas durchsichtiges Band von Endospermgewebe bilden; die ursprünglich in diesen Zellen befindliche Stärke ist von dem Embryo während seines frühesten Wachstums und ehe er in seinen Ruhezustand überging, verbraucht worden. Nach 24—36stündiger Keimung werden die Zellwände dieses Gewebebandes erweicht und zum Teil gelöst. Mit fortschreitender Keimung kann man auch eine Lösung der Wände der stärkeführenden Zellen beobachten, welche unterhalb der Aleuronschicht beginnt und allmählich von den nächsten zu den entfernten Teilen des Endosperms vorschreitet. Solange als diese Zellwände unversehrt sind, kann man keine Einwirkung der Diastase auf die Stärke beobachten; erst wenn die Zellwände verschwunden sind, setzt die diastatische Lösung ein.

Brown und *Escombe* haben ähnliche Veränderung beobachtet in dem Endosperm von Gerstenkörnern, von denen der Embryo sorgfältig entfernt war. Die Veränderungen beginnen unmittelbar unter der Aleuronschicht und verbreiten sich von dort in das Innere des Korns. Die erste Wirkung des Keimprozesses ist die Trennung der Aleuronschicht von den Zellen, die in ihrer Nähe liegen, auf Grund der Lösung der Zellwände an dieser Stelle.

Wenn man den Fortgang der Lösung der Zellwände genau verfolgt, so kann man folgendes feststellen: Zunächst schwillt die Zellwand leicht an und ihre Schichtung wird deutlich sichtbar. Die einzelnen Lamellen werden dann nach einander zerstört, wo-

Digitized by Google

bei sich die Mittellamelle als die dauerhafteste erweist. Schliefslich bricht die ganze Zellwand in lauter sehr kleine spindelförmige Bruchstücke auseinander, wobei ihre Längsseiten sich tangential an die ursprüngliche Zellwand anordnen. Zum Schlufs verschwinden auch diese Bruchstücke. Das ganze Endosperm wird in diesem Teile mehlig noch vor der Lösung der Stärke.

Derselbe Wirkungsverlauf kann auch in anderen Gräsern verfolgt werden, besonders bei Bromus mollis und Bromus asper, bei denen die Wände der Endospermzellen ganz besonders verdickt sind.

Brown und *Morris* stellten fest, inwieweit die Auflösung der Zellwände der des übrigen Zellinhaltes voraufgehe und zwar durch Untersuchung von Gerstenkörnern, die 5 Tage gekeimt hatten. Zu dieser Zeit waren die Zellwände spurlos verschwunden aus den meisten der am nächsten gelegenen Endospermzellen; eine Einwirkung auf die Stärkekörner konnte zu diesem Zeitpunkte nur innerhalb einer Entfernung von 0,15 mm vom Schildchen konstatiert werden.

Man kann die Cytase aus keimender Gerste besonders leicht gewinnen. Wenn man in einen Auszug von Luftmalz Gerstenschnitte einlegt, so wird das parenchymatische Gewebe in 24 Stunden zerstört, wobei die Zellwände entweder verschwinden oder in sehr geschwollenem und sehr verändertem Zustand zurückbleiben.[1]) Durch vorheriges Erwärmen des Auszuges auf 60 bis 70° C. wird dessen cytatische Kraft zerstört, ein darin eingelegter Gewebeschnitt bleibt auf unbestimmte Zeit unverändert. Die Wirkung des Luftmalzauszuges ist nicht beschränkt auf Gersteschnitte, denn darin eingelegte Kartoffelschnitte verlieren ihren Zusammenhang nach wenigen Stunden und fallen mit grofser Leichtigkeit in Stücke auseinander. Man kann dabei beobachten, dafs die Zellwände aufschwellen und in zahlreiche sehr dünne Lamellen zerlegt werden, die später in spindelförmige Bruchstücke zerfallen und schliefslich verschwinden mit Ausnahme einer dünnen Schicht, wahrscheinlich der Mittellamelle. *Brown* und *Morris* fanden, dafs sich das Parenchym verschiedener Pflanzen nicht in derselben

[1]) Bei der Keimung der Gerste sind die Zellwände im Endosperm nach dem 5. Tage keineswegs spurlos verschwunden, sondern es bleibt noch nach *Grüfs* ein Rest, welcher durch Congorot noch schwach gefärbt werden kann. *W.*

Digitized by Google

Weise verhielt. Die Artischoke, Karotte und Runkelrübe verhielten sich in dieser Beziehung ähnlich der Kartoffel, die Zellwände der roten Rübe wurden jedoch nur schwach angegriffen und die des Apfels ganz und gar nicht. Auch greift die Cytase nicht die verdickten Zellwände des Endosperms der Palmen an. Diese Beobachtungen brauchen uns jedoch nicht zu überraschen, wenn wir uns der wahrscheinlichen Unterschiede erinnern, die in derartigen Zellmembranen herrschen, wie im Anfang dieses Kapitels dargelegt wurde.

Brown und *Morris* stellten die Cytase in derselben Weise dar, wie die Diastase. Sie fällten einen Malzauszug mit Alkohol, entwässerten den Niederschlag und trockneten ihn im Vakuum. Dieser Niederschlag enthielt jedoch neben der Cytase noch Diastase.[1])

Die Wirkung der Cytase wird in schwach ameisen- oder essigsaurem Medium erhöht.

Die Cytase greift nur unveränderte Zellwände an, sie ist dagegen ohne Wirkung auf Zellwände, die bereits zum Teil verholzt oder verkorkt sind.

Brown und *Morris* zeigten, dafs die Sekretion der Cytase, ebenso wie die der Diastase, sich in den Zellen der Aleuronschicht abspielt, in geringem Mafse in denen des Schildchenepithels. Sie benutzten hierbei dieselbe Methode wie bei der Diastase, die bereits im vorigen Kapitel beschrieben ist. Die Sekretion beider Enzyme scheint abhängig zu sein von dem Nahrungsbedürfnis des Keimlings; sie scheint also eine Hungererscheinung zu sein.

Brown und *Escombe* zeigten, dafs die Aleuronschicht bei der Bildung der Cytase viel stärker beteiligt ist als das Schildchen. In den ersten Stadien des Keimprozesses rührt die Mehligkeit des Korns fast ausschliefslich von dem dort ausgeschiedenen Enzym her; die Sekretion des Schildchenepithels ist um diese Zeit von ganz untergeordneter Bedeutung.

Die Cytase kommt nicht nur in der keimenden Gerste vor, sondern auch in gewissen Abarten im ruhenden Korn. Es scheint

---

[1]) Nach *Reinitzer* enthält die keimende Gerste kein Enzym, welches auf Cellulose einzuwirken vermag; die Hemicellulose der Endospermzellhäute läfst sich ebenso leicht spalten wie die Stärke. *Reinitzer* stellt den Satz auf: „Die von *Brown* und *Morris* in der keimenden Gerste angenommene Cytase kommt in ihr nicht vor. Die Gerste erzeugt kein von der Diastase verschiedenes Enzym, das Cellulose oder Hemicellulosen zu lösen vermöchte. *W.*


Digitized by Google

ein Zusammenhang zu bestehen zwischen ihrem Vorkommen und den klimatischen Einflüssen, unter denen das Getreide gezüchtet wird. Je günstiger diese sind, um so weniger Enzym ist vorhanden. *Brown* behauptet, dafs Cytase im Kaltwasserauszug des Gerstenkornes nachgewiesen werden kann; ihr Einflufs bei der Selbstlösung der Zellwände ist oft deutlich bemerkbar, wenn das grob gemahlene Schrot mit Wasser kurze Zeit bei 35—40° C. digeriert wird.

Brown hat die Cytase auch im Roggen und Hafer gefunden, in letzterem in besonders reichlicher Menge. Ein wässeriger Haferauszug bewirkt in der That ein schnelleres Schwellen und Lösen der Cellulose, als ein Auszug aus der gleichen Menge Luftgerstenmalz.

Cytase widersteht nicht so hohen Temperaturen wie die Diastase; sie wird bei 60—65° C. zersetzt, während die Diastase zu diesem Zwecke über 70° C. erhitzt werden mufs.

Die Gräser sind besonders reich an Cytase, gleichwohl fehlt sie in anderen Pflanzen nicht. Sie ist von *Gardiner* im Endosperm von Tamus communis gefunden worden, worin sie die verdickten Zellwände des Endosperms während der Keimung der Samen angreift. Die Zellmembranen dieses Endosperms hängen zusammen mit dem Protoplasma der benachbarten Zellen, dessen Fäden man durch die Wände hindurch verfolgen kann, noch ehe sie sich verdicken. Die Cytase wird im Innern der Zellen ausgeschieden und geht längs der verbindenden Fäden bald nach Beginn der Keimung in die Substanz der Zellwand über. Der Übergang setzt an verschiedenen Stellen der Zellwand ein; wenn die Cytase einmal in diese eingedrungen ist, so kann man ihre Wirkung durch die Substanz der Membrane verfolgen, da sie schnell deren völlige Zerstörung bewirkt. Die angegriffenen Wände schwellen nicht so auffällig, wie in den bereits erwähnten Fällen, doch wird ihre Schichtung sehr deutlich. In diesem Falle ist aber die Mittellamelle diejenige Schicht, die der Wirkung des Enzyms am wenigsten widersteht.

Noch in einigen weiteren Pflanzen ist die Gegenwart der Cytase wahrscheinlich, hauptsächlich in den Palmen, bei denen die Kohlenhydrat-Reservestoffe der Samen die Form sehr stark verdickter Zellwände aufweisen. Die verdickende Substanz besteht aus einer Art Cellulose, wahrscheinlich gemischt mit Pektinstoffen. Man hat sorgfältig nach einem Enzym in derartigen

Digitized by Google

keimenden Samen geforscht, jedoch ohne Erfolg, obwohl mehrere Thatsachen auf ihre Anwesenheit schliefsen lassen. Der Keimprozefs verläuft jedoch so langsam, dafs das Enzym, wenn es wirklich existieren sollte, zu einem gegebenen Zeitpunkt nur in kleiner Menge vorhanden ist und daher sehr leicht bei dem gewöhnlichen Extraktionsverfahren entgehen kann.

Von den Palmensamen wurde zuerst der Samen der Dattel (Phoenix dactylifera) untersucht, über dessen Keimung *Sachs* einige Beobachtungen im Jahre 1862 veröffentlichte. Der Embryo ist ungefähr in der Mitte des harten Samens eingebettet; bei der Keimung bleibt er mit einem Teil des Samenlappens an den Samen angeheftet, wobei der Samenlappen zu einem Aufsaugeorgan umgebildet wird. Dieses greift, solange die junge Pflanze wächst, das Endosperm an, bis der Cellulose-Vorrat erschöpft ist. Die Oberfläche dieses Aufsaugeorgans ist mit einem Epithel bedeckt, das dem Schildchen-Epithel der Gräser sehr ähnelt. *Sachs* vermutete, dafs die Zellen dieser Schicht eine Cytase abscheiden, er wies sie jedoch nicht unzweideutig nach.

Grüfs wies ein Enzym in diesen Samen nach, das auf Reserve-Cellulose, wenn auch sehr langsam, einwirkt. Es liefert als Endprodukt wahrscheinlich Mannose.

Der Verfasser machte eine Reihe von Beobachtungen im Jahre 1887 über die Keimung der Samen von Livistonia humilis, die eine ähnliche Struktur aufweisen wie die Dattelkerne. Der Verlauf der Vorgänge war derselbe, den *Sachs* beobachtete. Die Epithelzellen waren sehr körnig und färbten sich mit Jod und Hofmannsblau tief dunkel. Bei der Benutzung dieser und anderer Färbemittel konnten einige weitere Beobachtungen über das Verhalten der Cellulose gemacht werden. Nach zweimonatiger Keimung war das Aufsaugeorgan ungefähr durch die Hälfte des Endosperms durchgedrungen. Die Zellen des letzteren, die mit dem Samenlappen zusammenhingen, wurden an ihren Ecken abgebrochen; fügte man zu der angegriffenen Fläche Chlorjodzink, so färbten sich die dem Samenlappen zunächstliegenden Zellen tiefviolett, während die weiter zurückliegenden sich nur mattblau färbten. Auf diese Weise wurden zwei scharf markierte Zonen sichtbar, die von der chemischen und physikalischen Konstitution der Zellwände abwichen. Eine

Digitized by Google

wässerige Jodlösung färbte die innere Zone mattblau, liefs jedoch die äufsere Zone unbehelligt. Mit Hofmannsblau färbte sich die innere Zone nach aufsen hin tief, während die Färbung nach dem unveränderten Endosperm immer blasser wurde. Die äufsere Zone, die durch Chlorjodzink schwach gefärbt wurde, wurde durch Hofmannsblau nicht gefärbt. Der innere tiefgefärbte Teil war stark geschwollen, und die äufseren Umrisse der Zelle waren unbestimmt. Nach dem Augenschein konnte man schliefsen, dafs die Cellulose allmählich hydratisiert wurde; die Veränderung ging vom Aufsaugeorgan aus und schritt nach aufsen vor.

Beim Kochen der Schnitte des zerfallenden Endosperms mit *Fehling*scher Lösung schied sich auf der Oberfläche der inneren Zone ein reichlicher Niederschlag von Kupferoxydul aus. Kleine Mengen dieser Verbindung konnte man auch in der an den Samenlappen anstofsenden, in der Auflösung begriffenen Schicht beobachten; das Oxydul wurde jedoch allmählich immer weniger gegen das Innere der inneren Zone; darüber hinaus war es ganz verschwunden. Die Höhle des Endospermes zeigte nach Entfernung des Aufsaugeorganes auf seiner ganzen Oberfläche eine Ablagerung ven Kupferoxydul. Es hatte also offenbar eine Umwandlung der Cellulose in eine *Fehling*sche Lösung reduzierende Substanz stattgefunden, jedenfalls in irgend eine Zuckerart.

Bei der Untersuchung verschiedener Gummisorten und der diese liefernden Bäume fand *Lutz*, dafs bei der Akazie Gummilagerräume in der Borke und im Pericykel (Pericambium) vorkommen. Diese bestehen aus Lücken, die dadurch gebildet werden, dafs die Zellwände ungeheuer aufschwellen und schliefslich gelöst werden. Seine Untersuchungen führten ihn zu der Annahme, dafs dieser Vorgang auf eine Art Cytase zurückzuführen sei.

Elfvings Beobachtungen über die Keimung des Gräserpollens führten zur Annahme, dafs im Pollenschlauch Cytase vorhanden ist, die das Gewebe des Griffels durchdringt, indem sie ihren Weg durch die Mittellamelle bahnt, ohne in deren Räume einzudringen.

De Bary beschreibt einen Mikroorganismus, Bacillus amylobacter, der bei der Zerstörung zerfallender Pflanzenteile mitwirkt und sich durch Zerstörung der Zellmembranen bethätigt. *De Bary* sagt, der Organismus zersetze die Cellulose unter Bildung von Dextrin und Dextrose und zwar unter Entbindung eines Enzyms.

Digitized by Google

Er greift verkorkte Membranen nicht an, auch nicht die der Bastfaser, der untergetauchten Wasserpflanzen, der Moose und vieler Pilze, zersetzt jedoch schnell die Zellwände fleischiger und saftiger Gewebe, z. B. der Blätter, krautiger Stengel und der weicheren Holzarten.

Die Lösung der Cellulose im Tierkörper wird jedenfalls durch ähnliche Organismen zuwege gebracht. *Griffiths* fand andererseits, dafs die im Eingeweide des Erdwurmes (Lumbricus) gefundene Verdauungsflüssigkeit Cellulose löst. Für das Vorkommen der Cytase in jenen Mikroben hat man bis jetzt noch keinen bündigen Beweis. *De Bary* teilt bei seinen bereits erwähnten Versuchen keine solchen mit, durch die er die Bildung von Cytase nachweist, und für jetzt kann dies kaum als feststehend betrachtet werden. Auch den Zersetzungsvorgang, den er beschreibt, hat er nicht durch einen Versuch begründet.

Vignal wies nach, dafs Bacillus mesentericus vulgatus eine Cytase absondert, die die Mittellamelle pflanzlicher Zellen löst.

Die Produkte der Cytasethätigkeit sind bis heute noch nicht in zufriedenstellender Weise erforscht. Die Zersetzungen sind zweifellos sehr verwickelt, wie man schon aus dem verschiedenen Charakter der Zellwände schliefsen kann. Die Cellulosebestandteile der letzteren liefern schliefslich einen Zucker, während die Pektose in Metapektinsäure verwandelt wird. Unter der Einwirkung von Säuren, hauptsächlich von Schwefelsäure, kann die Cellulose durch eine Reihe von Dextrinen hindurch zu Dextrose verzuckert werden. Einige ihrer Modifikationen liefern bei der Hydrolyse Pentosezucker und Hexosezucker. Die Pektosen liefern eine Reihe von gelatinösen Hydraten und gleichen in dieser Beziehung den schleimliefernden Bestandteilen vieler Samen. Schliefslich bildet sich Metapektinsäure, die wahrscheinlich identisch ist mit der Arabinsäure, die in grofser Menge im arabischen Gummi gefunden wird. Aus letzterem kann durch fortgesetzte Hydrolyse Galaktose (eine Hexose) und Arabinose (eine Pentose) erhalten werden.

Nach *Tollens* und *Gans* kann Cellulose in einen Zucker übergeführt werden, den sie Seminose nennen, und der wahrscheinlich mit der Mannose identisch ist. Sie stellten ihn dar durch Erwärmen von Schleim mit verdünnten Säuren. *Reifs* stellte denselben Zucker durch Kochen von Reserve-Cellulose mit verdünnter Schwefelsäure dar.

Digitized by Google

Cross und *Bevan* behaupten, dafs die Oxycellulosen, wie sie in verholzten Zellwänden vorkommen, beim Kochen mit Schwefelsäure, zunächst konzentrierter, dann verdünnter, zu Kohlenhydraten von niederem Molekulargewicht gelöst werden, wobei sich Dextrose und manchmal auch Mannose bilde. Die Pekto-Cellulosegruppe, bei der die Zellwände aus gewöhnlichem Parenchym bestehen, liefern aufserdem Galaktose und die beiden Pentosen Xylose und Arabinose. Galaktose wurde erhalten aus den Zellwänden der Samen von Lupinus luteus, Soja hispida, Coffea arabica, Pisum sativum, Cocos nucifera, Phoenix dactylifera etc. Mannose erhält man in verhältnismäfsig grofser Menge aus vielen Samen, besonders aus den Samen von Phytelephas, und Pentosen aus den Samen der Getreidegräser und verschiedenen Leguminosepflanzen.

Reifs hat festgestellt, dafs bei der Hydrolyse der Cellulose aus den Samen von Phönix und Phytelephas zunächst ein dem Dextrin entsprechender Körper gebildet wird. Er ist linksdrehend. Bei weiterer Hydrolyse liefert er einen rechtsdrehenden Zucker, der identisch ist mit der Seminose von *Tollens* und *Gans*. *Schulze* erhielt sowohl Galaktose, als auch eine Pentose, wahrscheinlich Arabinose, aus den verdickten Wänden der Zellen der Cotyledonen von Lupinus luteus.

Bourquelot und *Hérissey* haben kürzlich eine Art Cytase beschrieben, die auf Pektin einwirkte und dessen Gelatinierungs-Vermögen zerstörte, wobei ein reduzierender Zucker gebildet wurde. Sie stellten sie aus gekeimter Gerste, die bei 30 bis 35° C. langsam getrocknet war, durch Extraktion mit Chloroformwasser und Ausfällen mit Alkohol dar. Der Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet. Sie stellten folgende drei Versuche an:

1. 15 ccm einer 1prozentigen Lösung der Fällung wurden mit 15 ccm einer 2prozentigen Pektinlösung gemischt.

2. Ähnlich, nur dafs die Enzymlösung vorher aufgekocht war.

3. Mischung wie unter 1., nur dafs noch 0,05 g Kalk zugefügt wurden.

Diese drei Flüssigkeiten wurden alsdann bei Zimmertemperatur 24 Stunden digeriert. Nach dieser Zeit hatten die Flüssigkeiten 1 und 3. die Fähigkeit verloren, zu gelatinieren, die jedoch bei 2. nicht gestört war. Alkohol gab mit 2. einen reich-

Digitized by Google

lichen gelatinösen Niederschlag, mit den beiden anderen Versuchsflüssigkeiten aber nicht. Bei der Titration mit *Fehling*scher Lösung gab 2. kein Kupferoxydul, während 1. 11 mg Zucker, berechnet als Dextrose und 3. 36 mg desselben Zuckers enthielt. Sie schreiben den Unterschied zwischen 1. und 3. dem schwachen Säurecharakter des Pektins zu, der die Wirkung des Enzyms hindert Diese Säure war bei Versuch 3 mit Kalk neutralisiert worden.

Es ist noch nicht klargestellt, ob dieses Enzym von dem von *Brown* und *Morris* entdeckten verschieden ist, da diese Forscher nicht ermittelt haben, welcher Bestandteil der Zellwand davon angegriffen wird.

Aus dem, was jetzt bekannt ist, kann man auf zwei Arten von Cytase schliefsen, eine die die Mittellamelle und eine zweite, die die darüber liegenden Schichten sehr leicht angreift. Die erste umschliefst die von *de Bary, Marshall Ward, Gardiner* und *Vignal* entdeckten Enzyme, die zweite die Cytase der Gräser und Palmen.

Carubinase.

Ein Enzym, das mit der Cytase vieles gemein hat, wenn es nicht damit identisch ist, hat *Effront* beschrieben. Es kommt in den Samen des Johannisbrotes (Ceratonia siliqua) vor, die manchmal als Futter Verwendung finden. Diese Samen enthalten ein besonderes Kohlenhydrat, eine Art Galaktan, das sich sowohl von der Stärke als auch der Cellulose unterscheidet, obwohl seine Zusammensetzung der der letzteren ähnlich zu sein scheint. Wenn die Samen, befreit von der Umhüllung, mit heifsem Wasser auf dem Wasserbade digeriert werden, so liefern sie eine durchscheinende Gallerte, die im verdünnten Zustande nur etwas sirupartige Beschaffenheit hat und durch Seide filtriert werden kann. Alkohol in der doppelten Menge und Barythydrat fällen aus dieser Gallerte ein Kohlenhydrat, das durch Wiederauflösen und Wiederfällen mit Alkohol gereinigt werden kann. Nach dem Trocknen bei 100° stellt dieses Produkt eine weifse, schwammige, zerreibliche Substanz dar, die sich mit Jod nicht färbt und der die Formel $C_6 H_{10} O_5$ zukommt. Wenn sie in Wasser oder in schwache Sodalösung eingeweicht wird, bildet sie wieder eine Gallerte oder eine zähe, durchsichtige Masse; 3 bis 4 g in einem Liter Wasser gelöst, liefern eine zähe Flüssigkeit

Digitized by Google

von sirupartiger Konsistenz. Die Substanz ist in Salzsäure in der Kälte löslich, die Lösung reduziert nicht *Fehling*sche Lösung und ist ohne Einwirkung auf das polarisierte Licht. Bei der Oxydation mit Salpetersäure liefert sie nur kleine Spuren von Schleimsäure, woraus hervorgeht, dafs sie kein Pektinkörper ist. Dieses neue Kohlenhydrat ist von *Effront* nicht nur in dem Johannisbrot, sondern auch in Roggen- und Gerstenkörnern beobachtet worden. Es scheint ein Glied der Cellulosegruppe zu sein und dem Schleim in seinen Reaktionen zu ähneln. Während der Keimung des Johannisbrotes wird dieser Körper, dem *Effront* den Namen Carubin beilegt, leicht hydratisiert durch die Wirkung eines Enzyms, das er Carubinase nennt. Die Hydrolyse geht zunächst schwach von statten, wird jedoch kräftig, sobald in der jungen Pflanze Chlorophyll sich entwickelt.

Bei seinen Versuchen ging *Effront* folgendermafsen vor: die Samen des Johannisbrotes wurden im Mörser zerquetscht und mit Wasser, dem einige Tropfen Chloroform zugesetzt waren, extrahiert, in der Weise, dafs nach 24stündigem Stehen bei 30° C. ausgeprefst und das Extrakt filtriert wurde. Letzterers wurde dann auf Enzym untersucht. In Bechergläsern wurden 50 ccm Wasser, 1 ccm Normalameisensäure und 1 g gepulvertes Carubin zusammengebracht. Nach dem Durchmischen wurde in jedes Becherglas eine gemessene Menge des Extraktes, sowie als Antiseptikum etwas Chloroform zugegeben. In jedem Falle wurden Kontrollversuche in der Weise gemacht, dafs der Auszug vorher eine halbe Stunde auf 90° C. erwärmt wurde. Die Wirksamkeit des Extraktes wurde bestimmt durch den Grad der Fähigkeit, zu gelatinieren, die in jedem Falle nach bestimmten Zeiten verblieb. Die Kontrollproben blieben vollkommen gelatinierbar, während die mit nicht erhitztem Extrakt mehr oder weniger vollständig verflüssigt wurden, wobei der Grad der Gelatinierungsfähigkeit umgekehrt proportional der Menge des zugesetzten Extraktes war. Bei weiterer Prüfung ergab sich, dafs letzterer das Carubin nicht nur verflüssigte, sondern es auch in einen reduzierenden Zucker überführte. Im Augenblick der Verflüssigung waren nur Spuren Zucker zugegen, von diesem Zeitpunkt ab nahm aber die kupferreduzierende Kraft der Mischung beständig während des ganzen Verlaufes des Versuches zu. Wurde im Augenblick der Ver-

Digitized by Google

flüssigung ein Überschufs von Alkohol zu der Flüssigkeit zugesetzt, so fiel ein Niederschlag aus, der ein Zwischenprodukt darstellte, stark rechtsdrehend und leicht löslich in Wasser war. Dieser Körper wurde durch verdünnte Mineralsäure leicht in Zucker übergeführt.

Der aus der Hydrolyse hervorgehende Zucker war nicht krystallisierbar und zwar eine Hexose. Mit Hefe war er vergärbar, und mit essigsaurem Phenylhydrazin lieferte er ein Osazon, das bei 183° schmolz. Der Zucker hatte dasselbe Reduktionsvermögen wie die Glukose, jedoch war sein spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha]_D = +24°$.

Effront giebt an, dafs das Enzym durch Zusatz der fünffachen Menge Alkohol zum Samenauszug ausgefällt werden kann. Bei seinen Versuchen war er mit Hilfe der beschriebenen Methode imstande, die Menge der in verschiedenen Stadien des Keimprozesses in den Samen vorhandenen Carubinase festzustellen.

Die Carubinase wirkt energisch bei 40° C., ihr Optimum liegt aber zwischen 45 und 50° C. Bei 70° C. wirkt sie nur noch lang sam, bei 80° C. wird sie zerstört. Sie wirkt schwach in neutraler Lösung, energischer bei Gegenwart von 0,01—0,03 $^0/_0$ Ameisensäure.

Das Wiesnersche Gummienzym.

Im Jahre 1885 beschrieb *Wiesner* ein im arabischen Gummi vorkommendes Enzym, das nach seiner Angabe Cellulose in Gummi oder Schleim überführt und das Stärke in Dextrin, aber nicht in reduzierenden Zucker überzuführen vermag. Bei seinen Versuchen benutzte er 5 ccm einer 2prozentigen Lösung von arabischen Gummi und 1 ccm dünnen Stärkekleister. Nach 6stündigem Digerieren bei 23° C. wurde die Stärkelösung klar; nach 24 Stunden gab sie die Erythrodextrinreaktion mit Jod, dann verschwand dieses Dextrin, und es verblieb nur Achroodextrin. Innerhalb 24 Stunden wurde kein reduzierender Zucker gebildet.

Reinitzer untersuchte später ebenfalls die Wirkung des arabischen Gummi und kam zu entgegengesetzten Schlüssen. Er fand, dafs die Gummilösung keine Wirkung auf Cellulose besitzt und dafs sie Stärkekleister in einen reduzierenden Zucker verwandelt. Er hält das Enzym daher nur für Diastase.

Digitized by Google

Kapitel VIII.

Zuckerspaltende Enzyme.

Die bislang besprochenen Enzyme haben eine gemeinsame Eigentümlichkeit; sie wandeln in verschiedenen Phasen verschiedene Kohlenhydrate um, wobei das Endprodukt ein Zucker ist, obwohl nicht in jedem Falle derselbe Zucker entsteht.

Ehe *Fischer* seine klassischen Untersuchungen über die Zucker veröffentlichte, gingen unsere Kenntnisse über diese kaum weiter, als dafs wir wufsten, dafs sie 6 Kohlenstoffatome oder ein Vielfaches davon im Molekül enthielten. Wir wissen, dafs Dextrose, Lävulose, Galaktose und Sorbose 6 Kohlenstoffatome enthalten. *Kiliani* zeigte, dafs ein anderer Zucker, die Arabinose, 5 Kohlenstoffatome enthält. *Fischer* hat gezeigt, dafs die einfacheren Zucker als Aldehyd-Alkohole oder als Keton-Alkohole zu betrachten sind und dafs als das einfachste der Glykolsäure-Aldehyd $C_2H_4O_2$ zu betrachten ist. Wir kennen nun eine Reihe dieser Zucker, deren aufeinander folgende Glieder sich von einander um CH_2O unterscheiden. *Fischer* hat gezeigt, dafs die Synthese dieser Zucker ebenso leicht durchgeführt werden kann, wie die organischer Säuren und anderer Verbindungen. Nach der Hypothese von *Le Bel* und *van 'tHoff* über das asymetrische Kohlenstoffatom giebt es von jedem dieser Zucker mehrere Isomere, ausgenommen vom ersten, wobei die Anzahl derselben wechselt je nach der Konfiguration des Moleküls. Nach der Theorie mufste es 16 verschiedene Zucker von der Formel $C_6H_{12}O_6$ geben, 12 davon sind bereits dargestellt.

Aufser diesen Zuckern giebt es noch eine andere Reihe, die Polysaccharide, die sich von den ersteren ableiten durch Elimination eines Moleküles Wasser aus zwei oder mehr Molekülen des einfacheren Zuckers.

Digitized by Google

Die Zersetzung, die sie beim Kochen mit verdünnten Säuren erleiden, kann durch die Gleichung $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$ ausgedrückt werden. Die resultierenden Hexosen können dieselben, aber auch verschiedene sein. Rohrzucker liefert Dextrose und Lävulose, Milchzucker Dextrose und Galaktose, Maltose giebt zwei Moleküle Dextrose.

In lebenden Organismen, sei es tierischen oder menschlichen, finden wir Enzyme, die fähig sind, die Hydrolyse dieser Polysaccharide mit Leichtigkeit durchzuführen. Bis jetzt kennt man deren sechs; sie heifsen: Invertase oder Invertin, Glukase oder Maltase, Laktase, Trehalase, Raffinase und Melizitase.

Invertase.

Im Jahre 1847 entdeckte *Dubrunfaut*, dafs Rohrzucker durch die Wirkung verdünnter organischer oder Mineralsäuren unter Wasseraufnahme zersetzt wird und in gleiche Teile Dextrose und Lävulose zerfällt, von denen die erstere die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts, letztere nach links dreht. Der Zersetzungsprozefs wurde als Inversion bezeichnet und hat dem zur Besprechung stehenden Enzym den Namen gegeben. Rohrzucker selbst dreht rechts, das aus seiner Umsetzung erhaltene Zuckergemisch dreht jedoch links. Das rührt daher, dafs das Linksdrehungsvermögen der Lävulose bedeutend gröfser ist, als das Rechtsdrehungsvermögen der Dextrose, und da die beiden Hexosen in der gleichen Menge gebildet werden, mufs das entstehende Gemisch den Strahl nach links ablenken.

Bei seinen Versuchen über den Inversionsprozefs konnte *Dubrunfaut* die beiden Hexosen durch Behandlung des Zuckergemisches, das man jetzt allgemein als Invertzucker bezeichnet, mit einem Kalksalz von einander trennen. Dieses geht mit beiden Hexosen Verbindungen ein, die der Dextrose ist jedoch am leichtesten löslich. Wird ein Gemisch der Zucker auf diese Weise behandelt, so krystallisiert der Lävulose-Kalk langsam aus und kann von dem Dextrose-Kalk durch Filtration getrennt werden. Die Krystalle können in einem Überschufs von Wasser gelöst, und beide Zucker durch Durchleiten von Kohlensäure durch die betreffenden Lösungen vom Kalk befreit werden.

Digitized by Google

Der Niederschlag von kohlensaurem Kalk wird durch Filtration getrennt, die Zucker bleiben in Lösung.

Dubrunfaut hat nicht das Enzym entdeckt, das diese Zersetzung des Rohrzuckers bewirkt. Letzteres blieb bis zum Jahre 1860 unbekannt, bis es *Berthelot* aus der Hefe isolierte. Seine Entdeckung steht im Zusammenhang mit der Thatsache, dafs Rohrzucker mit Hefe nicht vergährbar ist, sondern dafs der gebildete Alkohol von den Zuckern herrührt, in die der Rohrzucker sich bei der Hydrolyse spaltet. Frühere Forscher schrieben diese Inversion dem Säuregehalt der Hefe zu, *Pasteur* glaubte sie auf die Bernsteinsäure zurückführen zu müssen, die, wie er nachwies, bei der Gärung gebildet wird. *Berthelot* wies jedoch nach, dafs sie ganz unabhängig von der Reaktion der Flüssigkeit vor sich geht. Er zeigte, dafs die Inversion auf ein lösliches Prinzip zurückzuführen ist, das in dem Wasser vorhanden ist, in dem die Hefe gewaschen wurde und das daher voraussichtlich von den Hefenzellen abgeschieden wird. *Berthelot* gab diesem neuen Körper den Namen „ferment glucosique“.

Bei seinen Versuchen prefste er die anhaftende Würze von der Hefe ab, wusch sie mit Wasser und liefs sie dann mit der zweifachen Menge Wasser mehrere Stunden stehen. Nach der Filtration fand er im Wasser 1,5 % gelöste Substanz. Zunächst prüfte er *Pasteurs* Behauptung, dafs das wirksame Agens bei der Hydrolyse des Rohrzuckers die bei der Gärung gebildete Bernsteinsäure sei. Zu diesem Zweck fügte er etwas von seinem Auszug zu einer Rohrzuckerlösung von 20 %, die 2 % Soda enthielt. Unter diesen Umständen fand Hydrolyse statt, wobei die alkalische Reaktion der Flüssigkeit bis zum Schlufs anhielt. Es war also klar, dafs die Umwandlung nicht von der Säure bewirkt worden war.

Berthelot isolierte auch das Enzym, allerdings stellte er es nicht in reinem Zustand dar. Seine Methode bestand in der Fällung des Enzyms durch ein gleiches Volum Alkohol. Der Niederschlag fiel als zusammenhängende Flocken aus, die zu Boden gingen. Sie wurden von der Flüssigkeit durch Dekantation getrennt und mit Alkohol bei gewöhnlicher Temperatur gewaschen; man erhielt auf diese Weise eine gelbliche hornige Substanz im Gewicht von etwa $^1/_{50}$ der ursprünglichen löslichen Substanz. *Berthelot* fand, dafs eine Wiederholung dieser Prozedur die hydro-

Digitized by Google

lytische Kraft des Produktes erheblich schwächte. Bei einmaliger Fällung mit Alkohol konnten von einem Teil Enzym 50 –100 Teile Rohrzucker invertiert werden.

Im Jahre 1864 veröffentlichte *Béchamp* die Ergebnisse einiger Untersuchungen, die über die Verbreitung dieses Enzyms wesentlichen Aufschlufs geben. Aufser in der Hefe kommt es nach Angabe dieses Forschers in mehreren Schimmelpilzen und in gewissen Mikroorganismen vor, die er allerdings nicht genauer spezifiziert. Wenn diese Schimmelpilze in Lösungen von Rohrzucker zerquetscht wurden und die Masse filtriert wurde, so konnte man im Filtrat bald Dextrose nachweisen. Hat man eine genügende Menge des Pilzes zur Hand, so kann man aus ihm auf dieselbe Weise einen Auszug bereiten, wie dies *Berthelot* mit der Hefe that, oder aber das aktive Prinzip kann aus einem Aufgufs des Pilzes nach der Methode ausgefällt werden, die *Payen* und *Persoz* bei der Diastase angewandt haben. Auf alle Fälle fand man, dafs sie im stande war, Rohrzuckerlösungen von verschiedener Stärke zu hydrolisieren; sie verliert jedoch die Kraft beim Erhitzen auf 60 – 70° C.

Aufser dafs *Béchamp* die Invertase in Pilzen nachwies, suchte er auch nach ihr in den höheren Pflanzen. In der Voraussetzung, dafs die Gegenwart von Chlorophyll einen Grundunterschied zwischen der Natur des Stoffwechsels der grünen Pflanzen und dem der Pilze ausmacht, zog er den Schlufs, dafs diejenigen Teile der höheren Pflanze, die kein Chlorophyll besäfsen, jedenfalls dieselben Erscheinungen böten wie die Pilze. Er suchte z. B. das hydrolysierende Prinzip der Schimmelpilze in den gefärbten Teilen der verschiedenen Blumen. Obwohl sein Grundgedanke irrig war, so glückte es ihm dennoch, das Enzym in den Blumenblättern von Robinia viscosa, Robinia pseudoacacia, Papaver Rhoeas und einigen Arten der Rose zu finden, ebenso in den gefärbten Brakteen von Bougainvillea spectabilis. Er hat seine Versuche mit den Blumenblättern von Robinia viscosa genauer beschrieben. Er zerquetschte die Blumenblätter und prefste sie aus. Die Flüssigkeit teilte er in zwei Teile; zum einen fügte er eine gewisse Menge Rohrzucker und Wasser und beobachtete die Ablenkung des polarisierten Lichtes im 200 mm-Rohr. Mit der zweiten Hälfte wurde,

Digitized by Google

aber erst nachdem sie aufgekocht war, derselbe Versuch angestellt. Es zeigte sich, dafs der gekochte Auszug keine Änderung des Rohrzuckers herbeiführte. Die Wirkung der Mikroorganismen unterdrückte er durch einen Zusatz von zwei Tropfen Kreosot zu je 100 ccm der Digestions-Flüssigkeit. Die Proben wurden dann bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen und von Zeit zu Zeit auf ihr Drehungsvermögen untersucht. Die Ergebnisse waren folgende:

10 ccm Prefssaft, 20 g Rohrzucker, 2 Tropfen Kreosot, mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt	Saft nicht gekocht	Saft gekocht
Ursprüngliche Drehung	+29,52°	+29,52°
Drehung nach 24 Stunden Digestion.	+28,8°	+29,52°
„ „ 20 Tagen „ .	— 4,8°	+29,28°

Béchamp konnte das Enzym in den Blättern der Pflanzen nicht finden, eine Thatsache, die seine Hypothese in gewissem Sinne zu stützen schien. Als günstigste Temperatur fand er 40—50° C.

Béchamp war der Ansicht, dafs das Enzym aus den Pilzen nicht ganz identisch sei mit dem in den Blumen vorkommenden, da letzteres nach seiner Meinung nicht so wirksam war als das Pilzenzym. Er gab dem ersten den Namen Zymase, den er etwas später in Zythozymase änderte, während er das zweite Anthozymase nannte, um ihr Vorkommen anzudeuten.

Er fand einen ähnlichen Körper in den Früchten der Maulbeere; da er aber gleichzeitig fand, dafs der Saft der letzteren Stärkelösungen verzuckern konnte, glaubte er, dieser enthalte ein neues Enzym, das beide Eigenschaften besitze. Er nannte das neue Enzym Morozymase. Im Lichte späterer Forschungen können wir mit ziemlicher Gewifsheit sagen, dafs es ein Gemisch seiner Zymase mit Diastase ist.

Der Name Zymase wurde bald aufgegeben; aber nicht lange darauf wurde er für Enzyme allgemein gebraucht. Die Bezeichnung Invertin legte im Jahre 1875 *Donath* dem Enzym bei, und dieser Name wurde für das Enzym bis in die letzten Jahre gebraucht. Auch heute gebrauchen ihn noch Forscher auf dem Gebiete der Tierphysiologie zur Bezeichnung eines identischen Enzyms, das in tierischen Sekreten vorkommt. In der Pflanzen-Physiologie wurde der Name Invertin ersetzt durch Invertase.

Digitized by Google

Das Vorkommen dieses Enzyms unter den Ausscheidungen des tierischen Darmkanals wurde zuerst von *Claude Bernard* festgestellt. Er ermittelte, dafs Rohrzucker im Blute eines Tieres untauglich für die Ernährung ist. Wenn dieser Zucker in eine Vene eingespritzt wird, so wird er fast augenblicklich durch die Niere abgeschieden und erscheint unverändert im Urin. Wenn er aber dem Verdauungskanal durch den Mund zugeführt wird, so hat er einen entschiedenen Nährwert. *Bernard* konnte den Ort ermitteln, wo er hydratisiert wird, und zwar ist dies der Fall bei seinem Durchgang durch den Dünndarm; dabei werden dieselben reduzierenden Zucker gebildet, wie durch den Hefenauszug. Wenn man Rohrzuckerlösung in einen Darm bringt oder mit einem Auszug aus der Schleimhaut dieses Organs mischt, so reduziert die Flüssigkeit nach ganz kurzer Zeit *Fehling*sche Lösung, was der Rohrzucker nicht kann. Das Drehvermögen ändert sich zu gleicher Zeit, und der Vergleich mit einer durch verdünnte Säure invertierten Rohrzuckerlösung zeigt, dafs beide Flüssigkeiten dieselben Reaktionsprodukte enthalten. *Bernard* wies nach, dafs die Umwandlung des Rohrzuckers im Darm auf ein Enzym zurückzuführen ist, das mit dem von *Berthelot* aus der Hefe ausgezogenen identisch ist. Er wies das Invertin in den Eingeweiden von Kaninchen, Hunden, Vögeln und Fröschen nach. Andere späteren Forscher haben gezeigt, dafs es auch im Darmkanal einiger wirbelloser Tiere vorkommt; *Balbiani* fand es im Verdauungsapparat des Seidenwurmes. *Von Planta* behauptet, der Bienenmagen enthalte einen Saft, in dem Invertzucker vorkomme, obwohl die Nahrung aus Rohrzucker bestehe.

Bernards Entdeckung, dafs der tierische Organismus nicht im stande ist, Rohrzucker als solchen zu assimilieren, führte ihn zu der Ansicht, dafs diese Kohlenhydratform wahrscheinlich von keinem direkten Nährwert für das Pflanzenplasma sei, was eine Parallele zu dem Verhalten der Stärke wäre. Zur Begründung dieser Hypothese stellte er Untersuchungen an über die chemischen Prozesse, die sich abspielen bei der Entwickelung der roten Rübe nach der Bildung und dem Ruhezustand der fleischigen Wurzel. In der Lebensgeschichte dieser Pflanze kann man zwei scharf getrennte Perioden unterscheiden. Während des ersten Lebensjahres produziert sie nur Blätter; gegen Ende des Sommers wird

Digitized by Google

die Wurzel sehr dick und die unterirdischen Teile färben sich intensiv. Das saftige Gewebe der Wurzel enthält eine grofse Menge Rohrzucker, der nach dort von den Blättern während deren Sommerthätigkeit transportiert wurde. Nach dem Winter beginnt das Wachstum von neuem, ein neuer Stamm wird angesetzt, der Blätter treibt und im nächsten Sommer Blüten, Früchte und Samen ausbildet. Dieses erneute Wachstum geht vor sich auf Kosten der in der Wurzel abgelagerten Reservestoffe, deren hauptsächlichster der Rohrzucker ist. *Bernard* stellte fest, dafs zum Beginn dieser zweiten Periode thätigen Lebens der Rohrzucker in der Wurzel sich vermindert und mit fortschreitendem Wachstum immer weniger und weniger wird. Zu gleicher Zeit tritt Dextrose auf, die aufwärts längs des Stengels bis zur Wachstumsregion verfolgt werden kann. Dextrose erscheint auch in den Blättern, während Rohrzucker darin vollständig fehlt. *Bernard* fand ferner, dafs ein ähnliches Enzym, wie er es im tierischen Darmkanal entdeckt hatte, aus den von ihm untersuchten roten Rüben ausgezogen werden konnte; hiermit bewies er, dafs seine Hypothese wohlbegründet war und dafs sowohl im Tier-, als auch im Pflanzenkörper Rohrzucker erst hydrolysiert werden mufs, ehe er fähig ist, dem aktiven Protoplasma als Nährstoff zu dienen. Das Agens kann in beiden Fällen aus dem Sitz des Hydrolysierungs-Prozesses ausgezogen werden und ist zweifellos dasselbe Enzym.

In neuerer Zeit haben *Brown* und *Morris* die überkommene Anschauung von der primären Bildung der Kohlenhydrate in den Blättern wesentlich modifiziert auf Grund einer Reihe von Versuchen, die sie in Bezug auf die Physiologie dieser Organe anstellten. Über diese Versuche ist bereits im Zusammenhang mit dem Vorkommen der Translokations-Diastase in den Zellen des Mesophylls berichtet worden. Die Verfasser geben an, dafs Rohrzucker und nicht Dextrose der zuerst gebildete Zucker ist und dafs die Stärke, die bald in den Chloroplasten auftritt, das Zeichen für die Bildung eines Überschusses an diesem Kohlenhydrat ist. Da es fast feststeht, dafs Rohrzucker nicht direkt für die Ernährung des Protoplasmas verwertbar ist, und da die Zellen, in denen das Kohlenhydratmaterial bereitet wird, an einem sehr lebhaften Metabolismus (Säfte-Veränderungs-Prozefs) beteiligt sind, so ist es wahrscheinlich, dafs eine andere Zuckerart gebildet

Digitized by Google

wird, um ihre ersten Bedürfnisse zu befriedigen. Dieser Zucker kann aus zwei Quellen stammen, nämlich aus der Stärke, die in Maltose übergeführt, und aus dem Rohrzucker, der, wie in anderen Teilen der Pflanze, hydrolysiert werden kann. Es erscheint nach *Brown* und *Morris* wahrscheinlich, dafs der neugebildete Zucker als Nährstoff dient; der Überschufs wird als Stärke aufgespeichert. Nach dieser Annahme müfste in den Zellen zur Hydrolyse des Rohrzuckers Invertase vorhanden sein, um für das Protoplasma einen geeigneten Zucker zu schaffen. Es ist auch höchst wahrscheinlich, dafs eine derartige Vorhydrolyse sich mit dem Rohrzucker vollzieht, der der Vorläufer der Stärke ist, da letztere in näherer Verwandtschaft zu den Hexosen steht als das komplexe Polysaccharid. Die Hypothese von der Bildung des Rohrzuckers mit den darauffolgenden Umwandlungen scheint daher für die Existenz von Invertase in Laubblättern zu sprechen.

Brown und *Morris* stellten hierüber einige Versuche an. Sie pulverten einige lufttrockene Blätter von Tropaeolum in einem Mörser; 2 g des Pulvers wurden unter antiseptischen Vorsichtsmafsregeln mit 100 ccm einer Lösung, die 4,881 g Rohrzucker enthielt, sieben Tage lang bei 30° C. gehalten. Am Anfang reduzierte die Flüssigkeit *Fehling*sche Lösung nicht, am Ende des Versuchs reduzierte sie aber 2,064 g Kupferoxyd. Das Drehungsvermögen veränderte sich während der Zeit von 9,4° auf 7,2°. Aus diesen Zahlen läfst sich auf eine invertierende Wirkung der Blätter schliefsen, die einer Menge von 0,894 g Invertzucker entspricht, eine Menge, die annähernd 45 % des Gewichtes der benutzten trocknen Blätter entspricht. *Kosmann* hat ebenfalls Invertase in den Knospen und Blättern junger Bäume entdeckt.

Das Enzym ist auch in den Wurzelkeimen gekeimter Gerste aufgefunden worden, seine Extraktion ist jedoch mit beträchtlichen Schwierigkeiten verknüpft. *Kjeldahl* war der erste, der das Enzym hier fand, seine Angaben wurden später durch die Untersuchungen von *J. O'Sullivan* ergänzt. Dieser brachte eine bestimmte Menge frisch von der keimenden Gerste losgelöster Wurzelkeime in eine Rohrzuckerlösung und digerierte sie damit 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Bei Kontrollversuchen wurde an Stelle des Rohrzuckers Wasser genommen. Die Menge des im letzteren am Schlufs des Versuches vorgefundenen Invertzuckers wurde

Digitized by Google

als den Keimen zukommend in Abrechnung gebracht. In drei Versuchen erhielt er folgende Resultate:

1. 1,7 g feuchter Wurzelkeime invertierten 1,22 g Rohrzucker.

2. 0,5 g feuchter Wurzelkeime invertierten 1,37 g Rohrzucker.

3. 0,5 g feuchter Wurzelkeime invertierten 0,15 g Rohrzucker.

Wenn auch bei allen drei Versuchen eine Inversion stattfand, so war der Grad der Inversion doch nicht in allen Fällen derselbe, was wohl darauf zurückzuführen ist, dafs die in Arbeit genommenen Wurzelkeime verschiedene Mengen des Enzyms enthielten.

Das Vorkommen des Enzyms in Wurzelkeimen und die Schwierigkeit, die die Extraktion desselben darbietet, erhellt auch aus folgenden Versuchen *O'Sullivans*:

1. 0,75 g Wurzelkeime wurden in der Kälte 2 Stunden lang mit 10 ccm Wasser digeriert; der Auszug wurde filtriert und der Rückstand auf dem Filter so lange gewaschen, bis das Filtrat 50 ccm ausmachte. Zu 40 ccm des Auszuges wurden 25 ccm einer 10prozent. Rohrzuckerlösung gegeben.

2. Die zurückgebliebenen Keimlinge wurden zu weiteren 25 ccm Rohrzuckerlösung gegeben.

3. 0,75 g derselben ursprünglichen Keimlinge wurden zu weiteren 25 ccm Rohrzuckerlösung gegeben. Die drei Proben wurden dann bei 55—57° C. 8 Stunden digeriert, weitere 8 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann auf 100 ccm aufgefüllt. Der invertierte Rohrzucker wurde aus dem Reduktionsvermögen von 100 ccm der Lösungen bestimmt; es ergab sich folgendes:

1. Der Auszug aus 0,75 g Wurzelkeimen invertierte 0,19 g Rohrzucker.

2. Die bei 1. zurückgebliebenen Wurzelkeime invertierten 1,9 g Rohrzucker.

3. 0,75 g der ursprünglichen Wurzelkeime invertierten 1,6 g Rohrzucker.

Der in den Keimen von Hause aus enthaltene reduzierende Zucker war für sich bestimmt und in Rechnung gesetzt worden.

Die Invertase des Gerstenembryos war nicht auf die Wurzeln

Digitized by Google

beschränkt, sondern man fand sie auch in gewisser Menge in der Plumula. Dagegen enthielt das Endosperm des Kornes das Enzym nicht.

Aus diesen Versuchen, zusammengehalten mit denen von *Brown* und *Morris*, geht hervor, dafs der Rohrzucker und infolge dessen die Invertase bei der Ernährung des aktiv wachsenden Pflanzen-Protoplasmas eine sehr wichtige Rolle spielen.

Die Invertase ist von *Atkinson* und von *Kellner*, *Mori* und *Nagaoko* im Reis und in Koji gefunden worden. Koji ist ein besonderes Präparat aus Reis, das von den Chinesen vielfach zur Herstellung gegorener Flüssigkeiten benutzt wird. Der Reis wird unter besonderen Bedingungen mit dem Pilz Eurotium oryzae behandelt. Man weifs noch nicht bestimmt, ob der Reis oder der Pilz die Quelle des Enzyms ist.

Frankfurt hat das Enzym in isolirten Weizenembryonen gefunden. Invertase kommt nach *Mierau* in reifen Bananenfrüchten vor. Ein wässriger Auszug der Frucht, bei gewöhnlicher Temperatur hergestellt und einige Zeit bei 55° C. gehalten, war linksdrehend. *Mierau* giebt die Drehung an zu $[\alpha]_D = -7{,}65^0$; ein ähnlicher Auszug bei 100° hergestellt, war rechtsdrehend, nämlich $[\alpha]_D = +17{,}49^0$. Wenn die reife Frucht mit einer Rohrzuckerlösung digeriert wurde, so wurde die Richtung des polarisierten Lichtstrahles geändert. Bei einem Versuch änderte er sich von $+ 99{,}6$ nach $- 11{,}22^0$. *Mierau* scheint das Enzym aus der Frucht nicht extrahiert zu haben.

Die Invertase ist, wie wir gesehen haben, in den Reservestofflagern in verschiedenen Teilen der Pflanze mit Rohrzucker vergesellschaftet. Der Rohrzucker wird auch öfters noch an einer anderen Stelle für die spätere Ernährung aufgestapelt. Von vielen Pollenkörnern weifs man, dafs sie ihn in kleinen Mengen enthalten und ihn bei ihrer Auskeimung verbrauchen. *van Tieghem* entdeckte ihn hier zuerst im Jahre 1886; er liefs die Pollenkörner verschiedener Pflanzen in 10prozentiger Rohrzuckerlösung keimen und entdeckte in der von den Körnern abfiltrierten Flüssigkeit einen reduzierenden Zucker. Wenn die Pollenkörner unter Verhinderung des Auskeimens durch Zusatz von Chloroform in dieselbe Lösung gebracht wurden, so wurde das nämliche Resultat erhalten, so dafs er schliefsen konnte, dafs das

Digitized by Google

Enzym in den Pollenkörnern unabhängig vom Keimprozefs vorkomme.

Im Jahre 1893 wies der Verfasser das Enzym nach in den Pollen von Eucharis, Narcissus, Helleborus, Richardia, Lilium und Zamia; er konnte es aus den ruhenden Körnern ausziehen, indem er diese in Mörser zerstampfte und das Pulver mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahierte. Er konnte ferner feststellen, dafs seine Menge während der Keimung stark zunahm und dafs die Zunahme viel gröfser war, wenn man den Pollen in Rohrzucker wachsen liefs, als bei seiner Kultur in Wasser. Ein sehr beweiskräftiger Versuch wurde mit den Pollen von Narcissus poëticus angestellt. Die Pollen wurden von 906 Antheren gesammelt und wogen 0,3 g. Diese teilte man in drei Teile zu je 0,1 g. Ein Teil wurde in Chloroformwasser eingeweicht, einen zweiten liefs man in Wasser auf einer Glasplatte keimen, den dritten kultivierte man ebenso in einer 15prozentigen Rohrzuckerlösung. Als die Keimung gut vorgeschritten war, wurden die Kulturen von den Glasplatten sorgfältig abgewaschen und alle drei Proben mit Chloroformwasser auf 15 ccm aufgefüllt. Dann wurden alle filtriert, jede Probe mit 25 ccm 10prozentiger Rohrzuckerlösung versetzt und 93 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Dann wurde das Chloroform aus allen drei Proben durch Kochen entfernt und schliefslich wurden die Proben mit *Fehling*scher Lösung titriert.

Es wurden in den drei Fällen folgende Mengen Invertzucker gefunden:

A. (Ungekeimt) 0,19 g.

B. (Gekeimt in Wasser) 0,5 g.

C. (Gekeimt in Rohrzuckerlösung) 1,37 g.

Die Sekretion oder Bildung des Enzyms scheint hiernach wesentlich durch die Aufnahme des Nährstoffzuckers gefördert zu werden, der durch die Hydrolyse des ursprünglichen Kohlenhydrates entstand.

Aufser dieser sehr weiten Verbreitung in den höheren Pflanzen hat man die Invertase auch in vielen Pilzen aufser den bereits erwähnten gefunden. *Hansen* hat sie in verschiedenen Saccharomyceten gefunden. *Wasserzug* fand sie in gewissen Pilzen, die zum Genus Fusarium gehören und in Rohrzucker-

Digitized by Google

lösungen zu wachsen vermögen, wobei in der Kulturflüssigkeit Dextrose entsteht. Er konnte eine Sekretion des Enzyms durch das Mycelium feststellen, wenn er das Kulturmedium änderte. Wählte er als Substrat Kalbfleischbouillon, so ging Invertase in kleinen Mengen in diese über, wenn der Pilz seine Konidien entwickelte.

Im Jahre 1878 fand *Gayon*, dafs bei der Kultur von Aspergillus niger in Rohrzuckerlösung eine gewisse Menge Invertzucker gebildet wird, was *Duclaux* im Jahre 1883 bestätigte. *Fernbach* stellte im Jahre 1890 fest, dafs dies auf die Wirkung der Invertase zurückzuführen sei und wies nach, dafs die Sekretion des Enzyms nicht auf die Periode der Fruchtbildung beschränkt sei, sondern während der ganzen Lebensdauer des Organismus anhalte, wobei zu allen Zeiten annähernd gleichviel Enzym gebildet werde. *Bourquelot* fand 3 Jahre später, dafs ein Auszug des Myceliums von Aspergillus eine 2,5 prozent. Rohrzuckerlösung bei 24stündiger Digestion bei 22° C. vollständig invertierte.

Bourquelot entdeckte die Invertase im Jahre 1886 im Penicilium glaucum und konnte sie aus dem Mycel extrahieren, jedoch nur wenn der Pilz die Reife erlangt hatte. Eine verwandte Spezies, Penicilium Duclauxi, invertierte Rohrzucker, wenn sie in dessen Lösung kultiviert wurde, Invertase wurde jedoch in der Kulturflüssigkeit nicht entbunden. Das Enzym ist offenbar in diesem Pilze während dessen ganzer Lebensdauer vorhanden, da seine Sporen leicht in Rohrzuckerlösung auskeimen. *Fischer* und *Lindner* haben ein ähnliches Vorkommen des Enzyms in Monilia candida beobachtet, da dieser Pilz Rohrzucker hydrolysiert, das Enzym jedoch nicht extrahiert werden kann.

Die Invertase findet sich nicht gleichmäfsig in allen Pilzen. Nach *Bourquelot* ist sie z. B. im Polyporus sulphureus nicht enthalten. Ihre Verbreitung in der Pilzgruppe ist jedoch noch nicht genügend erforscht.

Die Invertase scheint in Bakterien sehr selten vorzukommen. *Fermi* und *Montesano* fanden, dafs Bacillus megatherium, B. fluorescens liquefaciens, der rote Kieler Bacillus und Proteus vulgaris sie in mit Rohrzucker versetzter Bouillon produzierten. *Van Tiegham* zeigte, dafs sie von Leuconostoc mesenteroïdes ausgeschieden wird. Der Verfasser hat es in

Digitized by Google

Kulturen eines Bacillus entdeckt, der in gewissen gallertartigen Massen, die das Zuckerrohr infizieren, symbiotisch mit einer Hefe vergesellschaftet ist. Es wird von den Mikroben in die umgebende Flüssigkeit abgegeben.

Es ist nicht sicher festgestellt, inwieweit die Wirkung der Invertase in diesen niederen Formen intracellular ist. Verschiedene Forscher stimmen nicht in der Frage überein, ob bei normalem Leben die Invertase in das umgebende Medium ausgeschieden wird. Die Meinung gewinnt jedoch die Oberhand, dafs das Enzym, wenn die Organismen unter günstigen Bedingungen wachsen, durch die dünne Zellwand austritt und aufserhalb der Zelle arbeitet. Sein Diffusionsvermögen ist jedoch nicht sehr grofs und häufig wird es nur in so geringer Menge ausgeschieden, dafs es der Beobachtung leicht entgehen kann. Dies ist besonders leicht der Fall, wenn man sich bei der Prüfung der Alkohol-Fällungsmethode bedient. Alkohol schadet der Invertase und zerstört sie jedenfalls ganz, wenn nur kleine Mengen davon vorhanden sind. Dies erklärt es, warum es einigen Forschern nicht gelungen ist, ihre Ausscheidung und Thätigkeit aufserhalb der Zelle zu beobachten.

Das Vorkommen der Invertase im Darmkanal der Säugetiere ist hauptsächlich auf den Dünndarm beschränkt, in dem sie, wie bereits erwähnt, *Bernard* jüngst entdeckte. *Miura* hat gefunden, dafs sie in kleineren Mengen auch im Grimmdarm, Magen und Pankreas vorkommt. Er entdeckte sie nicht nur im Verdauungstraktus der lebenden Tiere, sondern auch in dem noch ungeborener Tiere. *Abelous* und *Heim* fanden sie auch neben Diastase in den Eiern gewisser Krustentiere.

Es sind verschiedene Methoden zur Darstellung der Invertase aus einem oder dem anderen der Körper, in denen sie vorkommt, angegeben worden. *Hoppe-Seyler* tötete Hefe mit Äther, zog dann das Enzym mit Wasser aus, und fällte es hierauf mit Alkohol. *Gunning* zog es aus gewaschener Hefe mit Glycerin aus. Einer besser ausgearbeiteten Methode bedienten sich *Zulkowski* und *König*; diese beiden Forscher wuschen die Hefe mit Alkohol, trockneten und pulverten sie und extrahierten das Pulver mit Wasser. Nach der Filtration wurde das Filtrat mit Äther ausgeschüttelt, wodurch die Invertase als Froschlaich ähn-

Digitized by Google

liche Masse ausgeschieden wird. Die Ausscheidung wurde abermals mit Wasser extrahiert und das Enzym mit Alkohol ausgefällt. So dargestellt war sie in getrocknetem Zustande eine weifse, in Wasser mit neutraler Reaktion lösliche Substanz. Sie fällte Blei-, Kupfer- und Quecksilbersalze, war jedoch ohne Wirkung auf Eisenchlorid und Ferricyankalium; ihre Lösung trübte sich beim Kochen mit verdünnter Essigsäure nicht. Nach *Béchamp* hat sie ein Drehungsvermögen $[\alpha]_j = +41^{\circ}$.

O'Sullivan und *Tompson* haben die Wirkung der Invertase genauer erforscht. Sie stellten sie in grofser Menge aus gewöhnlicher obergäriger Prefshefe dar. Diese liefs man einen Monat bei etwa 15° C. stehen, bis sie sich vollständig verflüssigt hatte. Die flüssige Masse wurde dann in einer Schrauben-Filterpresse ausgeprefst, wobei sich eine klare gelbe Lösung ergab. Dann wurde Alkohol bis zu 47% zugegeben und das Gemisch 2 Tage stehen gelassen. Es hatte sich ein ziemlich klumpiger Niederschlag gebildet, die darüber stehende Flüssigkeit war völlig inaktiv. Man liefs den Niederschlag sich in grofsen Gefäfsen absetzen und löste ihn dann wieder in Wasser. Wurde der Alkoholgehalt der Flüssigkeit auf 28% gebracht, so ging die Invertase in Lösung, doch blieb ein beträchtlicher Teil Eiweifssubstanz ungelöst. Die Flüssigkeit wurde dann filtriert und wieder auf 47% Alkohol gebracht. Der Niederschlag trat wieder auf, wurde getrennt, mit absolutem Alkohol gewaschen, über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. So dargestellt, war die Invertase sehr aktiv, jedoch nicht ganz rein; sie enthielt ungefähr 5% Asche, die aus den Phosphaten des Kaliums und Magnesiums bestand. Die Forscher betrachten die Asche als Verunreinigung und glauben nicht, dafs sie im Molekül des Enzyms enthalten sei. Vergebens bemühte man sich, das Enzym über diesen Punkt hinaus zu reinigen, da es sich herausstellte, dafs es ein sehr unbeständiger Körper ist, der sich bei der weiteren Behandlung zersetzt. Er besafs ein Drehungsvermögen $[\alpha]_j = +80^{\circ}$. Die Hefe scheint die Invertase in einer Menge von 2—6% ihres Trockengewichtes zu enthalten.

Die Wirkung des Enzyms ist dieselbe wie die verdünnter Mineralsäuren: ein Molekül Rohrzucker nimmt ein Molekül Wasser auf und spaltet sich in zwei Moleküle, ein Molekül Dextrose und

Digitized by Google

ein Molekül Lävulose. Die Veränderung giebt sich kund im Drehungsvermögen und im Kupferreduktionsvermögen der invertierten Flüssigkeit. Rohrzucker besitzt kein Reduktionsvermögen.

Wenn die Invertase mit einer Rohrzuckerlösung vermischt wird, so ist ihre Wirkung zuerst eine sehr rasche, mit dem Verschwinden des Rohrzuckers nimmt sie aber immer mehr ab. Der Grad der Inversion kann immer durch eine bestimmte Zeitkurve dargestellt werden, wie sie *Harcourd* z. B. gegeben hat; sie drückt einen chemischen Vorgang aus, bei dem keine weitere Bedingung wechselt aufser der Verminderung der sich verändernden Substanz. So lange die Bedingungen, unter denen die Digestion stattfindet, unverändert bleiben, drückt diese Kurve den Verlauf dieser Umwandlung aus.

Unter den Bedingungen, welche den Fortgang der Invertasewirkung wesentlich beeinflussen, seien die Reaktion der Flüssigkeit, die Konzentration der Rohrzuckerlösung und die Digestionstemperatur hervorgehoben.

Sehr kleine Mengen Schwefelsäure beschleunigen die Wirkung in einer sehr bemerkenswerten Weise; die zur Erzielung des gröfsten Effektes nötige Menge wechselt jedoch mit der Menge vorhandener Invertase und mit der Temperatur, bei der die Hydrolyse durchgeführt wird. Je mehr Enzym in der Lösung vorhanden ist, um so gröfsere Mengen Säure sind zur Erzielung der günstigsten Wirkung nötig. Bei einer Digestionstemperatur von 50° C. fanden *O'Sullivan* und *Tompson*, dafs 0,4 prozentige Invertaselösungen am besten arbeiteten bei Gegenwart von 12,5 Permillion Schwefelsäure. In 1,5 prozentiger Invertaselösungen war die günstigste Menge Schwefelsäure 15 Permillion. Bei einem andern Versuch, der bei 15,5° C. mit einer Invertasemenge von 1,5 % der angewandten Zuckermenge ausgeführt wurde, betrug die günstigste Schwefelsäuremenge 75 Permillion; bei der 10fachen Menge Invertase war die günstigste Schwefelsäuremenge 250 Permillion. Zwischen den Invertasemengen und den Säuremengen, die zur Erzielung günstiger Wirkungen erforderlich sind, scheinen keine bestimmten Beziehungen zu bestehen.

Wenn man mit der Säuremenge über den günstigsten Punkt hinaus ging, wenn auch nur ganz wenig, so wirkte die Säure

Digitized by Google

sehr schädlich. In einem Versuch von *O'Sullivan* und *Tompson*, wobei eine 0,34 prozent. Invertaselösung benutzt wurde, erniedrigte ein Überschufs von nur 2 Permillion die Wirkung der Invertase ums Elffache.

Müller fand, dafs eine so schwache Säure wie die Kohlensäure die Hydrolyse beschleunigte.

Die Wirkung der kaustischen Alkalien, selbst in sehr kleiner Menge, ist sehr schädlich; auf pflanzliche Invertase wirken sie sofort und dauernd zerstörend. Dies scheint jedoch für das Enzym aus dem Dünndarm, das Hydrolyse auch bei alkalischer Reaktion des Darminhaltes bewirkte, nicht zuzutreffen.

O'Sullivan und *Tompson* fanden, dafs die günstigste Konzentration der Zuckerlösung bei etwa 20% liegt, wenn die Digestion bei 54° C. durchgeführt wird. Unter diesem Prozentgehalt nimmt die Geschwindigkeit der Hydrolyse schnell ab; stärkere Lösungen werden nur wenig langsamer invertiert, bis zu einer Konzentration von 40%. In gesättigten Lösungen ist die Hydrolyse sehr langsam und schwach.

Die Invertase wirkt noch bei einer Temperatur von etwas über 0°, wenn auch sehr langsam. Mit steigender Temperatur wächst auch die Wirkung des Enzyms, zuerst nur allmählich und dann bis 60° C. schneller. Nach *O'Sullivan* und *Tompson* verdoppelt sie sich etwa bei jeder Erhöhung um 10°. Der günstigste Punkt liegt zwischen 55 und 60° C. *Müller* fand die relative Wirksamkeit bei 6, 10, 20, 30 und 40° C. bezw. zu 9, 19, 36, 63 und 93 und die günstigste Temperatur etwas unter 50° C. Über 55° C. hinaus wird das Enzym langsam zerstört, und bei 75° C. ist die Zerstörung eine augenblickliche.

Alkohol wirkt schädlich, zumal in grofser Menge. Das Enzym fällt aus seiner Lösung bei 47% Alkohol unverändert aus; gröfsere Alkoholmengen zersetzen es jedoch. Wenn der Alkohol in kleinen Mengen auch die Zusammensetzung des Enzyms nicht ändert, so kann er doch seine hydrolysierende Kraft verringern. Bei Anwesenheit von nur 5% Alkohol in einem Digestionsgemisch, wird die Wirkung des Enzyms auf die Hälfte verringert.

Über den Einflufs der Produkte der Hydrolyse auf die Wirkung des Enzyms sind die Meinungen noch geteilt. *O'Sullivan*

Digitized by Google

und *Tompson* bestreiten einen derartigen Einfluſs, während *Müller* sie für ausgesprochen hemmend ansieht.

Die Kraft des Enzyms ist praktisch unerschöpflich; eine Probe, die das 100000fache ihres Gewichtes Zucker invertiert hatte, war nach *O'Sullivan* und *Tompson* noch wirksam; sie wiesen auch nach, daſs die Invertase selbst durch ihre Wirkung auf den Rohrzucker nicht zerstört oder wesentlich geschädigt wird.

Fernbach beobachtete, daſs sein Extrakt aus Aspergillus im Licht weniger wirksam war als im Dunkeln und daſs der schädigende Einfluſs der Beleuchtung mit dem Säuregehalt des Auszuges wuchs.

Eine sehr bemerkenswerte Beobachtung machten *O'Sullivan* und *Tompson* insofern, als sie feststellten, daſs die Invertase, wenn sie in einer Rohrzuckerlösung während der Hydrolyse erhitzt wurde, um 25° höher erhitzt werden konnte bis zur Zerstörung, als wenn sie in Wasser erhitzt wurde. Eine Besprechung dieser interessanten Thatsache muſs jedoch einem späteren Kapitel vorbehalten bleiben.

Die Bedeutung der Invertase sowohl im pflanzlichen als auch im tierischen Haushalte scheint in erster Linie, wie schon gesagt wurde, darin zu liegen, daſs sie Rohrzucker in andere, durch das Protoplasma assimilierbare Zucker überführt. Diese Art Umwandlung kann entweder im Innern der Zelle, in denen das Enzym ausgeschieden wird, stattfinden, wie z. B. in den meisten pflanzlichen Zellen, oder auſserhalb derselben, wie im Darmkanal des tierischen Organismus. Bei der Hefe scheint der Inversion des Zuckers eine Ausscheidung von Invertase voraufzugehen. *Onimus* zeigte, daſs, wenn man eine Verteilung von Hefe in destilliertem Wasser durch Pergamentpapier in eine Lösung von Rohrzucker diffundieren lieſs, in dieser nach 15—20 Minuten eine Inversion zu beobachten ist. Die Hefezellen wachsen auſserhalb des Dialysators erst 12 Stunden später. Er vermutet, daſs die Sekretion der Invertase erst den richtigen Nährboden für eine Entwickelung der Hefezellen bereitet.

Die Invertase wirkt hauptsächlich, wenn auch nicht ausschlieſslich, auf Rohrzucker. *O'Sullivan* zeigte, daſs sie auch Raffinose hydrolysiert, jedoch bedeutend langsamer. Die Produkte

Digitized by Google

scheinen Galaktose, Dextrose und Lävulose zu sein. *Bourquelot* fand kürzlich, dafs sie auch Gentianose hydrolysiert, einen besonderen Zucker, der in den Wurzeln bestimmter Gentianaarten vorkommt. Ähnlich wie Rohrzucker reduziert auch Gentianose nicht *Fehling*sche Lösung; sie dreht das polarisierte Licht nach rechts. Bei der Inversion wird ein reduzierender linksdrehender Zucker gebildet. *Bourquelot* hält die Gentianose für ein sehr komplexes Polysaccharid, das in seinem Molekül Rohrzucker und eine andere Polyglukose enthält und glaubt, dafs die Invertase nur die erstere Gruppe angreift.

Digitized by Google

Kapitel IX.

Zuckerspaltende Enzyme (Fortsetzung).

Glukase (Maltase).

Bei der Besprechung der Wirkung der Diastase auf Stärke wurde darauf aufmerksam gemacht, dafs die Endprodukte der Verzuckerung verschiedene seien, je nachdem die Diastase dem einen oder anderen Teil des tierischen Verdauungsapparates entnommen war. Das Enzym des Speichels verwandelt Stärke in Maltose; unter den Verzuckerungsprodukten, die in den Eingeweiden gebildet werden, tritt mit Bestimmtheit Dextrose auf; auch der aus der Leber kommende Zucker ist Dextrose. Man war sehr ungewifs darüber, ob eine oder mehrere Arten von Diastase existieren, die durch die Art der verschiedenen, von ihnen gebildeten Zucker charakterisiert sind.

Beim Studium des Schicksals der Maltose im Haushalte des Körpers fand man, dafs dieser Zucker ebenso wie der Rohrzucker, mit dem sie isomer ist, ohne vorherige Hydrolyse von den Geweben nicht aufgenommen wird. *Philips* zeigte im Jahre 1881, dafs die in das Blut eines Tieres eingespritzte Maltose zum gröfsten Teil unverändert durch den Urin wieder ausgesondert wird, ebenso wie der Rohrzucker, wenn auch nicht in so grofsem Mafse. Führt man dagegen auf dieselbe Weise Dextrose in den Blutlauf ein, so wird diese vom Organismus verbraucht. *Dastre* und *Bourquelot* fanden im Jahre 1884, dafs, wenn die Menge der eingespritzten Maltose nicht zu grofs ist, ein Teil dieses Zuckers von der Niere nicht zerstört wird und dafs daher sein Schicksal sich von dem des Rohrzuckers etwas unterscheidet, da ein Teil der Glukose auf alle Fälle von dem Organismus nutzbar gemacht wird.

Die Ähnlichkeit, die die Maltose in Bezug auf die Zusammensetzung mit dem Rohrzucker hat, zusammengehalten mit dem,

Digitized by Google

was wir über das Schicksal des Rohrzuckers wissen, und mit der Thatsache, dafs Dextrose unter den Verzuckerungsprodukten der Stärke in den Eingeweiden auftritt, alles das deutet darauf hin, dafs die Maltose invertiert wird, bevor sie aufgenommen wird. Die Maltose ist einer hydrolytischen Spaltung fähig: beim Kochen mit verdünnten Säuren spaltet sie sich nach der Gleichung:

$$C_{12} H_{22} O_{11} + H_2O = C_6 H_{12} O_6 + C_6 H_{12} O_6,$$

wobei zwei Moleküle Dextrose gebildet werden, statt einem Molekül Dextrose und einem Molekül Lävulose, wie dies bei der Hydrolyse des Rohrzuckers der Fall ist. Die Maltose unterscheidet sich in ihrem Drehungsvermögen vom Rohrzucker und von der Dextrose; es ist $[\alpha]_D = +140^0$ in 10prozentiger Lösung bei 20^0 C., während der der Dextrose $+52{,}5^0$ ist. Maltose reduziert alkalische Kupferoxydlösung, aber nur zwei Drittel so stark als Dextrose. Während der Hydrolyse der Maltose wächst also das Kupferreduktionsvermögen, während das Drehvermögen abnimmt.

Brown und *Morris* veröffentlichten 1880 ihre Untersuchungen über die Veränderungen bei der Verdauung im Dünndarm. Sie prüften das Verhalten des Pankreas des Schweines und der Schleimhaut des Dünndarmes desselben Tieres. Sie stellten aus einem wirksamen Pankreas einen Auszug her, der Maltose hydrolysierte, wobei Dextrose gebildet wurde, doch war die Wirkung nur eine schwache. Bei ihren Versuchen mit dem Darm benutzten sie nicht das frische Gewebe, sondern sie trockneten ihn bei 35^0 C. im Luftstrom, zerschnitten ihn dann und behandelten mit den Stücken eine Maltoselösung bei 40^0 C. Sie fanden, dafs dabei die Maltose in Dextrose mit grofser Leichtigkeit verwandelt wurde, viel leichter als dies mit dem Pankreas der Fall war. Sie glaubten, dafs der wirksamste Teil des Darmes das Stück sei, in dem die *Payer*schen Drüsen vorkommen, da diese Gebilde wirklich lymphatische Häute darstellen. Ein Stück getrockneten Darmes aus diesem Teil hydrolysierte eine Maltoselösung in sieben Stunden vollständig. Sie kamen so zu der Ansicht, dafs die Verzuckerung der Stärke im Dünndarm in zwei Phasen verläuft; die eine wird eingeleitet durch den Pankreassaft, wobei die Stärke in Maltose verwandelt wird; die andere darauf folgende verläuft hauptsächlich unter dem Einflufs des Darmsaftes, aber mit Unterstützung seitens des Pankreassaftes,

Digitized by Google

und besteht in der weiteren Verzuckerung der Maltose zu Dextrose. Sie stellen ferner die bereits ausgesprochene Behauptung auf, die Maltose sei für den lebenden Organismus nicht direkt assimilierbar.

Brown und *Heron* wiesen ferner darauf hin, dafs die Verdauung der Maltose der des Rohrzuckers, wenn auch nicht gleich, so doch ähnlich sei. Sie fanden, dafs der Dünndarm letzteren invertieren kann, jedoch nicht so wirksam wie die Maltose. Der Pankreasauszug, der Maltose schwach hydrolysierte, konnte bei ihren Versuchen Rohrzucker nicht invertieren; ebensowenig vermochte dies das Drüsengewebe selbst.

Im Jahre 1881 bestätigte *von Mering* die Beobachtungen von *Brown* und *Heron* über die Rolle des Pankreas. Er fand, dafs der Auszug aus einem Hundepankreas Maltose langsam hydrolysierte.

Im Jahre 1883 führte *Bourquelot* eine Reihe von Versuchen mit dem Kaninchen aus, durch die er die Ergebnisse früherer Forscher bestätigte und erweiterte. Er benutzte die frischen Gewebe und führte die Versuche unter antiseptischen Versuchsmafsregeln durch. Seine Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: 1. Beim Kaninchen produzieren während der Verdauung sowohl der Pankreas als auch der Dünndarm ein Enzym, das Maltose zu hydrolysieren vermag. 2. Dieses Enzym findet sich im Dünndarm in gröfserer Menge als im Pankreas. 3. Es wird fast ausschliefslich im mittleren Teil des Dünndarmes gebildet. Teile des Dünndarmes in der Nähe des Pförtners oder in der Nähe des Dickdarmes sind fast oder ganz ohne Wirkung. 4. Das Enzym ist verschieden von Invertase, denn das Enzym des Pankreas, das Maltose hydrolysiert, ist ohne Wirkung auf Rohrzucker und die Hefeninvertase (die mit dem Invertin identisch ist) ist ohne Wirkung auf Maltose.

Bourquelot richtete dann seine Aufmerksamkeit auf das Pflanzenreich und wählte für seine Versuche zwei Pilze, Aspergillus niger und Penicillium glaucum, die beide vorzüglich in einer Maltoselösung wachsen.

Er zerrieb die Mycele mit Sand in einem Mörser und zog die teigige Masse mit etwas Wasser aus. Nach der Filtration fügte er zum Filtrat Alkohol; den entstehenden Niederschlag trennte er durch Filtration und trocknete ihn bei niederer Tempe-

Digitized by Google

ratur. Der Niederschlag war löslich in Wasser, und seine Lösung hydrolysierte Maltose schnell.

Angesichts der Thatsache, dafs die Hefe Maltoselösungen ebenso vergären kann wie Rohrzuckerlösungen, hielt *Bourquelot* es für wahrscheinlich, dafs in beiden Fällen die Hydrolyse der Polysaccharide der alkoholischen Gärung voraufgehen müsse. Er konnte jedoch das neue Enzym in der Hefenzelle nicht bestimmt nachweisen; einige Versuche führten ihn jedoch zu der Annahme, dafs es darin enthalten sei. Wenn er zu einer Maltoselösung Hefe setzte und das Wachstum der letztern durch einen Chloroformzusatz hinderte, so konnte er bald eine Verminderung des Drehungsvermögens und eine Erhöhung des Reduktionsvermögens der Maltoselösung beobachten. Beide Erscheinungen begleiten, wie wir bereits gesehen haben, die Hydrolyse der Maltose. *Bourquelot* schlofs aus diesen Versuchen, dafs die Hefe in Maltoselösungen ein Enzym ausscheidet, das diesen Zucker hydrolysiert; die dabei entstehende Dextrose wird dabei gleichzeitig in Alkohol und Kohlensäure zerlegt, wobei die alkoholische Gärung direkt hinter der Hydrolyse einsetzt.

Fischer hat auch dieses Enzym in der Hefe nachgewiesen.

Die Abweichungen der Ergebnisse *Bourquelots* und *Philips* bezüglich des Schicksals der ins Blut eingespritzten Maltose, klärten sich durch die Entdeckung von *Dubourg* im Jahre 1889 auf, dafs das Blut das in Rede stehende Enzym enthält. *Dubourg* mischte das Blut eines 5 Tage auf Kohlenhydratnahrung gesetzten Kaninchens mit der doppelten Menge einer Maltoselösung und hielt das Gemisch 2 Tage bei 37,5° C. Er fand nach dieser Zeit das Drehvermögen wesentlich vermindert und das Kupferreduktionsvermögen wesentlich erhöht. Die Wirkung war nicht sehr energisch, doch wurde es wahrscheinlich, dafs, wie dies bei *Bourquelots* Versuch der Fall war, bei einer Einspritzung von wenig Maltose ins Blut genügend Enzym vorhanden war, um diesen Zucker zu hydrolysieren, so dafs keine Maltose durch die Nieren ausgeschieden wurde; wurde dagegen, wie dies *Philips* that, eine gröfsere Menge Maltose eingespritzt, so wurde nur ein Teil hydrolysiert und der Rest erschien im Urin.

Bourquelot hat diesem Enzym den Namen Maltase gegeben.

Digitized by Google

Im Jahre 1886 beschrieb *Cuisinier* unter dem Namen Glukase ein Enzym, das er in Gerstenmalz und mehreren Getreidesamen entdeckt haben wollte und das Stärke in Dextrose überführen sollte. Seine Schlüsse fanden etwas später Widerspruch durch *Lintner*, wurden jedoch im Jahre 1891 durch *Géduld* bestätigt, der aus dem Mais ein lösliches Ferment auszog, das Maltose hydrolysierte. *Cuisiniers* Enzym scheint ein Gemenge von Diastase und Glukase gewesen zu sein, die nebeneinander vorkommen, ähnlich wie im Pankreassaft.

Géduld und nach ihm andere Forscher wandten den Namen Glukase auf das Enzym an, das Maltose hydrolysiert und das früher von *Bourquelot* Maltase benamst war. *Géduld* wollte es aus dem Mais in ziemlich reinem Zustande erhalten haben. Es enthält 8,12 % Stickstoff, ist in Wasser nur wenig löslich und giebt mit Gujaktinktur und Wasserstoffsuperoxyd eine blaue Färbung. Es vermag nur etwa sein Hundertfaches an Maltose zu hydrolysieren, so dafs es schwach zu nennen ist im Vergleich zu der von *O'Sullivan* und *Tompson* dargestellten Invertase. Es ist bei 57—60° C. am wirksamsten; über diese Temperatur hinaus wird es geschwächt und bei 70° C. erleidet es Zersetzung.

Seit *Dubourgs* Entdeckung der Glukase im Blut im Jahre 1889 haben viele Forscher sich mit ihrem Vorkommen im Blut und den Geweben und Säften des tierischen Körpers beschäftigt.

Im Jahre 1893 fand *Bial*, dafs sowohl Blutserum als auch Lymphserum Enzyme enthalten, die Stärke in Dextrose verwandeln und auch auf Dextrin und Maltose einwirken. Diese Enzyme sind in den Blutkörperchen nicht vorhanden. Wird zu Serum Alkohol gesetzt, der entstandene Niederschlag absitzen lassen und dann mit Wasser ausgezogen, so verwandelt der Auszug die Stärke nur in Maltose, hat auf diese aber weiter keine Wirkung. Die beobachtete Wirkung scheint demnach auf die Gegenwart von Diastase neben Glukase im Serum zurückzuführen zu sein, wobei letztere durch den Alkohol zerstört wird.

Im Jahre 1894 prüfte *Röhmann* vergleichsweise die verzuckernden Eigenschaften des Serums, Speichels, Pankreassaftes und Darmsaftes und kam zu dem Schlufs, dafs sowohl Diastase als auch Glukase in allen vieren vorkommen, doch in sehr verschiedenem Verhältnis. Speichel bildet bei der Einwirkung auf

Digitized by Google

Stärke in der Hauptsache Maltose und Dextrin, aber auch eine Spur Dextrose. Pankreassaft verhält sich ähnlich, liefert aber mehr Dextrose. Serum ist in letzterer Beziehung wirksamer als beide. Andererseits verzuckert Pankreassaft die Stärke schneller als Speichel, während letzterer in dieser Beziehung wirksamer ist als Serum. Während alle vier Flüssigkeiten beide Enzyme enthalten, kommt die Diastase am reichlichsten im Pankreassaft und Speichel vor, in der geringsten Menge im Serum; die Glukase ist dagegen in der gröfsten Menge im Serum und in nur kleiner Menge in den andern Flüssigkeiten enthalten.

Bourquelot und *Gley* haben ebenfalls Glukase aus Serum dargestellt.

Röhmanns Ergebnisse wurden im darauffolgenden Jahr durch *Hamburger* bestätigt, der dieselben vier Flüssigkeiten verglich. Seine Versuche ergaben, dafs eine gleichzeitige Einwirkung aller vier auf lösliche Stärke nach zweierlei Richtung hin Unterschiede beobachten liefs. 1. Das Kupferreduktionsvermögen bei 24stündiger Verzuckerungsdauer ist verschieden. 2. Die Zeit zur Erreichung des Kraftmaximums ist ebenfalls verschieden. Setzt man das Reduktionsvermögen der Dextrose gleich 100, so ist das der 24stündigen Speicheldigestion 31, der Pankreasflüssigkeit 36, der Darmsaftdigestion 26 und der Serumverzuckerungsflüssigkeit 80. Das höchste Reduktionsvermögen wurde beim Speichel in einer Stunde erreicht, beim Blut erst nach 24stündiger Einwirkung. Pankreassaft wirkte schneller als Speichel, Darmsaft langsamer als Blut. Während Speichel schnell wirkt, ist die reduzierende Kraft des Produktes gering, Blut auf der anderen Seite wirkte langsam, das Reduktionsvermögen dagegen ist hoch, eine Erscheinung, die *Hamburger* auf die Verschiedenheit der gebildeten Zucker zurückführt, der beim Speichel hauptsächlich Maltose, beim Blut dagegen Dextrose ist. Er kommt zu dem Schlufs, dafs die Glukase hauptsächlich in reichlicher Menge im Blut vorkommt; Speichel enthält mehr Diastase als Blut und Darmsaft, aber kaum eine Spur Glukase; Pankreassaft enthält mehr Diastase als Speichel und Glukase in ganz bemerkenswerten Mengen. Darmsaft enthält weniger Diastase als Blut und mehr Glukase als Speichel, aber nicht soviel als Blut oder Pankreassaft.

Im Jahre 1893 prüfte Fräulein *Tebb* verschiedene Gewebe

Digitized by Google

aus dem Darmkanal auf ihren Gehalt an Glukase. Ihre Untersuchungsmethode stützte sich auf die von *Brown* und *Heron*, und gleich diesen experimentierte sie mit den Geweben des Schweines.

Manchmal arbeitete sie mit Infusionen, die sie herstellte durch Eintragen der getrockneten und zerkleinerten Organe in Salzwasser, manchmal mit den getrockneten Geweben selbst. Die Trockentemperatur war 37—40° C. In allen Fällen machte sie Kontrollversuche, bei denen die getrockneten Gewebe oder deren Auszug aufgekocht worden war. Die Salzlösungen waren gewöhnlich 5prozentige Glaubersalzlösungen und die Auszüge wurden stets unter antiseptischen Vorsichtsmafsregeln gemacht. Sie fand, dafs trockner Pankreas, die Schleimhäute des Dünndarmes, die *Peyer*schen Lappen, Lymphdrüsen, Speicheldrüsen, Leber, Niere, Magen, Milz und die gestreiften Muskel Maltose hydrolysierten. Die relative Wirksamkeit gleicher Mengen des getrockneten Gewebes dieser Organe war sehr verschieden. Ihre Ergebnisse lassen sich in folgender Tabelle zusammenstellen:

Schleimhaut des Dünndarmes . . .	3,21
Milz	1,35
Lymphdrüsen	0,93
Leber	0,80
Die *Peyer*schen Lappen	0,64
Niere	0,66
Magen	0,45

Die Zahlen geben das Verhältnis von gebildeter Glukose zu 1 Teil unverändert gebliebener Maltose an.

Aufser in diesen Geweben fand Fräulein *Tebb* die Glukase im Serum von Schweineblut und in der Galle aus der Gallenblase desselben Tieres.

Pregl fand Glukase im Darmsaft eines jungen Lammes und *Pautz* und *Vogel* in der Schleimhaut des Darmkanals von Hunden und neugeborenen Kindern. Die wirksamste Region war der Leerdarm (Jejunium), doch invertierten auch Magen, Krummdarm und Grimmdarm etwas Maltose.

Von hohem Interesse ist die Entdeckung der Glukase in der Leber. Wie wir bereits gesehen haben, ist der dieses Organ verlassende Zucker nicht Maltose, sondern Dextrose. Bei früheren

Digitized by Google

Arbeiten über die Diastase in der Leber waren die meisten Forscher der Ansicht, dafs, wenn in diesem Organ überhaupt ein Enzym vorkomme, dieser von der Diastase des Speichels und des Pankreassaftes verschieden sei, da es Dextrose und nicht Maltose aus Glykogen bilde. Auf alle Fälle ist der Zucker in der Lebervene Dextrose. Fräulein *Tebbs* Untersuchungen haben es wahrscheinlich gemacht, dafs die sogenannte Leberdiastase ein Gemenge von Diastase und Glukase ist; erstere verzuckert Glykogen zu Maltose und die zweite vollendet die Hydrolyse der Maltose zur Dextrose.

Über das Vorkommen der Glukase in gekeimter Gerste und anderen Cerealien ist man sich noch nicht recht einig. *Morris* glaubt, dafs es ein dem Mais eigentümliches Enzym sei; er konnte Maltose nicht invertieren durch Kaltwasserauszüge von Gerste, Malz, Hafer, Roggen oder Weizen. Andererseits erhielten *Ling* und *Baker* aus Darrmalz einen Auszug, der bei der Einwirkung auf eine Lösung von löslicher Stärke sowohl Dextrose als auch Maltose bildete. Sie vermuten, dafs die Glukase während des Darrprozesses vermindert wird. Liefs man etwas von diesem Auszug auf Maltose allein einwirken, so wurde diese zum Teil in Dextrose verwandelt. *Kröber* glaubt, dafs die Glukase in normalem Malz vorkomme.

Verschiedene Arten von Hefen enthalten Glukase. *Fischer* und *Lindner* fanden sie im Saccharomyces octosporus, dessen Auszug Maltose hydrolisiert, auf Rohrzucker aber ohne Wirkung ist. Saccharomyces Marxianus hingegen hydrolisiert den letzteren, hat aber keine Wirkung auf Maltose. *C. J. Lintner* fand in anderen Hefen beide Enzyme, wobei die Glukase weniger löslich ist als Invertase. *Fischer* kam bei der Frohberg-Hefe zu demselben Ergebnis.

Lintner und *Kröber* haben die Wirkung der Glukase studiert, die sie durch Extraktion der getrockneten Hefezellen mit Wasser bei gewöhnlicher Temperatur erhielten. Sie fanden ihre günstigste Wirkung bei 40 ° C., was auf einen Unterschied zwischen diesem Enzym und dem von *Géduld* aus dem Mais isolierten Enzym schliefsen läfst. Letzteres arbeitete am besten bei 57—60 ° C. Die Hefenglukase unterscheidet sich in dieser Beziehung auch von der Invertase, die nach *Lintner* und *Kröber* bei 52—53 ° C.

Digitized by Google

am günstigsten wirkt. Ihre Glukase wurde bei 55° C. zerstört. Bei Temperaturen unter 35° C. war ihre hydrolytische Wirksamkeit proportional der Temperatur, wenn die vorhandene Enzymmenge und die Digestionsdauer dieselben blieben. Eine Erhöhung der Enzymmenge beschleunigte nicht in dem gleichen Verhältnis die Inversion.

Aufser dafs die Glukase auf Maltose wirkt, hat *Fischer* festgestellt, dafs sie auch noch verschiedene künstliche Glukoside zersetzt, die er aus verschiedenen Zuckern, Methyl- und anderen Alkoholen und Salzsäure darstellte. Er hat auf diese Versuche eine Theorie über die Wirkung der Enzyme im allgemeinen aufgestellt, die in einem späteren Kapitel besprochen werden soll.

Er hat auch festgestellt, dafs die Glukase auf verschiedene natürliche Glukoside einwirkt, die bei der Hydrolyse Dextrose liefern. Das Bemerkenswerteste unter diesen ist das Amygdalin, das in gewissen Pflanzen, die hauptsächlich zu den Rosaceen gehören, vorkommt. Wie wir später sehen, erleidet das Amygdalin Hydrolyse unter dem Einflufs eines unter dem Namen Emulsin bekannten Enzymes. Die Umwandlung läfst sich durch folgende Gleichung versinnbildlichen:

$$C_{20}H_{27}NO_{11} + 2H_2O = C_6H_5COH + HCN + 2(C_6H_{12}O_6)$$

Amygdalin — Benzoesäure-Aldehyd — Blausäure — Dextrose

Glukase greift das Amygdalin in anderer Weise an; statt es nach vorstehender Gleichung zu spalten, spaltet es daraus nur Dextrose ab unter Bildung eines neuen Glukosids, das nur eine Dextrosegruppe in seinem Molekül enthält. Der Zucker des Amygdalins scheint Maltose zu sein, die zu Dextrose hydrolysiert wird, entweder so lange sie noch mit dem Glukosid verbunden ist oder wenn dieses vollständig zersetzt wird.

Trehalase.

Die die Zuckergruppe bildenden Zuckerarten gehören zum Teil zu den Polysacchariden, zum Teil zu den einfachen Hexosen. Von den ersteren ist der charakteristischste die sogenannte Trehalose. Diesen Zucker beschrieb zuerst im Jahre 1857 *Berthelot*. Er fand ihn in der Syrischen Manna. Fast zu gleicher Zeit ent-

Digitized by Google

deckte ihn *Mitscherlich*, der ihn auf Roggen fand, der von dem Mutterkornpilz (Claviceps purpurea) befallen war. *Müntz* fand ihn in verschiedenen Arten der Hymenomyceten im Jahre 1873; neuerdings behauptet *Bourquelot*, daſs er in vielen zu verschiedenen Gruppen gehörigen Arten vorkommt, obwohl er unter den Pilzen nicht allgemein verbreitet ist.

Berthelot schrieb ihm die Formel $C_{24}H_{74}O_{22}$ zu; er beschrieb ihn als leicht und in groſsen, dem Kandiszucker ähnlichen Krystallen krystallisierend; er soll jedoch nicht so süſs schmecken als Rohrzucker. Neuere Untersuchungen haben zur Formel $C_{12}H_{22}O_{11} + 2H_2O$ geführt. Er scheint der Maltose zu ähneln, indem er, wie diese, bei der Hydrolyse in zwei Moleküle Dextrose zerfällt.

Er ist in den Pilzen, in denen er vorkommt, nicht während deren ganzen Lebensdauer anzutreffen; in der gröſsten Menge findet er sich darin gerade vor der Periode der Fruktifikation oder Sporenbildung. Wenn man einen Pilz, in dem er vorkommt, pflückt und bei ziemlich warmer Temperatur aufbewahrt, so verschwindet der Zucker. Er wird in dem Saft von Lactarius piperatus ausgeschieden, wenn man diesen Pilz in einem geschlossenen Gefäſs Chloroformdämpfen aussetzt.

Bourquelot fand gelegentlich seiner ausgedehnten Untersuchungen über das Vorkommen der Zucker in den Pilzen, daſs der Bildung von Dextrose die Bildung von Trehalose stets vorausgeht; er kam so zur Annahme, daſs letztere durch ein bestimmtes Enzym hydrolisiert wird, ebenso wie Rohrzucker durch Invertase und Maltose durch Glukase. Er bewies die Richtigkeit dieser Annahme durch Versuche, die er zunächst auf die drei Arten Aspergillus niger, Penicillium glaucum und Volvaria speciosa beschränkte. Die Organismen wurden zunächst 4 Tage in Rohrzuckerlösung kultiviert, bis sie reichlich Sporenträger entwickelt hatten. Dann wurden sie in einem Mörser mit trockenem Sand zerrieben und mit Alkohol sechs Stunden stehen gelassen. Nach dem Filtrieren wurde der Rückstand zwischen Filtrierpapier abgepreſst und im Vakuum getrocknet. Dann wurde die Masse einige Zeit mit Wasser maceriert, filtriert und das Filtrat mit starkem Alkohol versetzt. Der entstehende Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt, mit Alkohol gewaschen

Digitized by Google

und im Vakuum getrocknet. Das so bereitete Pulver enthielt, wie man aus anderen Untersuchungen wuſste, Invertase und Glukase.

Gelegentlich wurde auch eine andere einfachere Methode der Darstellung des Enzyms benutzt, die darin bestand, daſs die Kulturflüssigkeit durch destilliertes Wasser ersetzt wurde, das alle 12 Stunden erneuert wurde. Der Pilz entlieſs seine Enzyme in das Wasser, das nach zwei bis drei Tagen ganz entschieden das Vermögen aufwies, Rohrzucker und Maltose zu hydrolysieren. Der erste Auszug war nie sehr wirksam, wahrscheinlich infolge von kleinen Mengen Säure, die sich bei der Kultur des Organismus in der ursprünglichen Kulturflüssigkeit gebildet hatten.

Der auf die eine oder andere Weise dargestellte Auszug wurde mit Trehalose digeriert, die man aus Trehala gewonnen hatte, einer Art wachsiger Ausscheidung, die eine gewisse Coleopterus-Larve zur Bildung ihres Kokons ausscheidet. Es wurden 10 ccm des Auszuges zu 10 ccm einer etwa 2 prozentigen Lösung dieses Zuckers hinzugeben. Das Drehungsvermögen der Mischung betrug 3° 36′ im 200 mm-Rohr. Die Hydrolyse begann sofort, und bei 18stündiger Digestion bei 12—15° C. betrug die Ablenkung nur noch 2° 20′. Sie nahm stetig ab bis zum sechsten Tage, wonach keine Änderung mehr eintrat. Die schlieſsliche Ablenkung betrug 1°. Der reduzierende Zucker wurde dann titriert; es wurden in 100 ccm 0,98 g gefunden. In der Annahme, daſs alle Trehalose zu Dextrose hydrolysiert wurde, würde die berechnete Ablenkung sich auf 1,013° und die Menge des reduzierenden Zuckers auf 0,962 g in 100 ccm stellen, Zahlen, die recht genau mit den durch den Versuch erhaltenen stimmten.

Dieselben Versuche erhielt man mit der Trehalase, die aus den bereits angeführten Pilzen extrahiert war.

Bourquelot giebt an, daſs das Enzym, das die Hydrolyse der Trehalose bewirkt, sowohl von der Invertase, als auch von der Glukase verschieden ist, obwohl es mit diesen gemeinschaftlich im Mycel der beschriebenen Pilze vorkommt. Er gab ihm den Namen Trehalase; es arbeitet am besten in schwach saurer Lösung; der günstigste Säuerungsgrad betrug etwa 0,003 % Schwefelsäure. Gröſsere Mengen sind schädlich, in 0,2 prozentiger Säurelösung ist das Enzym beinahe wirkungslos. Ganz ähnlich verhält sich die Invertase unter gleichen Bedingungen.

Digitized by Google

Wenn der Auszug aus Aspergillus und der Niederschlag, den man durch Alkoholzusatz daraus erhält, auf Rohrzucker, Maltose und Trehalose einwirkt, so ist eine sorgfältige Prüfung der Frage am Platze, ob die sogenannte Trehalase nicht identisch ist mit Invertase oder Glukase. Die Invertase kann man außer aus dem Aspergillus noch aus anderen Organismen darstellen, und in vollkommen reinem Zustand ist sie auf Trehalose ohne Einwirkung. Es ist daher wahrscheinlich, daſs die bei den Versuchen beobachtete Zersetzung nicht auf die in den Pilzen enthaltene Invertase zurückzuführen ist.

Schwieriger ist schon die Entscheidung der Frage, ob die Trehalase mit der Glukase identisch ist oder nicht, da letzteres Enzym nicht leicht ohne Verunreinigung mit anderen erhalten werden kann. Sorgfältige Versuche über den Einfluſs der Erwärmung des Extraktes aus Aspergillus auf verschiedene Temperaturen und darauf folgende Einwirkung dieser Extrakte auf Trehalose einerseits und Maltose andererseits haben *Bourquelot* zu dem Schluſs geführt, daſs für die Hydrolyse dieser beiden Zucker zwei Enzyme existieren.

Er erhitzte den Auszug im Wasserbade, wobei er eine Reihe von 18 Röhren mit je 24 ccm Inhalt benutzte. Die Temperatur des Bades stieg ganz allmählich und die erste Probe wurde bei 44° C.' die zweite bei 46° C. und so fort genommen, alle 2° eine Probe, bis zu 78° C. Dann wurde der Röhreninhalt abgekühlt; je 10 ccm desselben wurden zu je 10 ccm einer 2prozentigen Trehaloselösung gegeben. Weitere je 10 ccm wurden zu je 10 ccm einer 0,25prozentigen Maltoselösung gegeben. Die Drehung der Trehaloselösung war 3° 40', die der Maltoselösung 3° 16'. Die Proben lieſs man dann 36 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und beobachtete die Drehung. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Erhitzt auf	Drehung der Trehalosegemische	Drehung der Maltosegemische
50°	1° 10'	1° 32'
52°	1° 10'	1° 32'
54°	1° 20'	1° 32'
56°	1° 24'	1° 32'

Digitized by Google

Erhitzt auf	Drehung der Trehalose-gemische	Drehung der Maltose-gemische
58°	1° 38′	1° 32′
60°	2° 18′	1° 32′
62°	2° 30′	1° 32′
64°	3° 40′	1° 32′
66°	3° 40′	1° 50′
68°	3° 40′	2° 05′
70°	3° 40′	2° 12′
72°	3° 40′	2° 24′
74°	3° 40′	2° 54′
76°	3° 40′	3° 16′
78°	3° 40′	3° 16′

Der Einfluſs der Temperatur ermöglichte es also, die beiden Enzyme zu unterscheiden. Trehalase beginnt bei 54° C. geschwächt zu werden, während Glukase auf 66° erhitzt werden kann, ohne Schaden zu nehmen. Die Wirksamkeit der Trehalase wird bei 64° C. zerstört, während Glukase bis zu 74° wirksam bleibt.

In einer folgenden Untersuchung zeigte *Bourquelot*, daſs die Trehalase auch im Polyporus sulphureus vorkommt, dessen Extrakt bei 48stündiger Dauer die Trehalose der Trehala in einen reduzierenden Zucker verwandelt. Er zeigte auch in Gemeinschaft mit *Gley*, daſs der Darmsaft Trehalose zu hydrolysieren vermag, daſs dagegen Pankreassaft und Blutserum eine derartige Wirkung nicht ausüben. Die Trehalase scheint somit sowohl in tierischen als in pflanzlichen Geweben vorzukommen. Ihr Vorkommen im tierischen Organismus ist von *Fischer* und *Niebel* nachgewiesen, die feststellten, daſs die Trehalose von einem Auszug aus dem Zwölffingerdarm einiger Tiere langsam hydrolisiert wird, während ein ähnlicher Auszug aus dem Darm anderer Herkunft ohne Wirkung ist. Das Serum gewisser Fische, besonders des Karpfen, hat dieselbe hydrolysierende Kraft.

Raffinase (Melibiase).

Ein anderes zu dieser Gruppe gehöriges Enzym zersetzt den Zucker, den man unter dem Namen Raffinose kennt. Dieses

Digitized by Google

Kohlenhydrat wurde entdeckt im Jahre 1876 von *Loiseau.* Es kommt in der Wurzel der Zuckerrübe, im Samen der Baumwollpflanze (Gossypium) und in Gerste und Weizen während der Keimung vor. *Tollens* hat gezeigt, dafs sie identisch ist mit der sogenannten Melitose im Eukalyptus-Manna.

Die Raffinose ist eine Hexatriose von der Formel $C_{18}H_{32}O_{16}$; bei der Hydrolyse mit verdünnter Mineralsäure spaltet sie sich in Dextrose, Lävulose und Galaktose. Nach *Scheibler* kann man bei Benutzung sehr verdünnter Säuren bei niedriger Temperatur den Nachweis führen, dafs die Hydrolyse in zwei Phasen verläuft:

$$\underset{\text{Raffinose}}{C_{18}H_{32}O_{16}} + H_2O = \underset{\text{Lävulose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Melibiose}}{C_{12}H_{22}O_{11}}$$

und

$$\underset{\text{Melibiose}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + H_2O = \underset{\text{Dextrose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Galaktose.}}{C_6H_{12}O_6}$$

Ihre Hydrolyse wurde von älteren Forschern der Invertase zugeschrieben, auch neuerdings von *O'Sullivan*; *Pautz* und *Vogel*, sowie *Fischer* und *Niebel* zeigten jedoch, dafs der Dünndarm des Hundes und Pferdes, der Invertase oder Invertin enthält, Raffinose nicht hydrolysieren kann. Ein Hefenauszug bewirkt diese Hydrolyse ebenso wie die des Rohrzuckers. Es ist wahrscheinlich, dafs die Hydrolyse der Raffinose durch ein besonderes Enzym bewirkt wird, das in der Hefe, nicht aber in der tierischen Membran enthalten ist.

Raffinose hat ein Drehvermögen $[\alpha]_D = + 103{,}12^0$ und reduziert *Fehling*sche Lösung nicht.

Bourquelot fand, dafs sie durch einen Auszug aus Aspergillus niger hydrolysiert wird. Bei seinen Versuchen mischte er 25 ccm einer 2prozentigen Lösung des Zuckers mit 25 ccm des Auszuges aus Aspergillus und digerierte sie 7 Tage bei 12 bis 15^0 C., wobei der Zutritt der Organismen verhindert wurde. Das Drehungsvermögen der Lösung war dann nur noch $[\alpha]_D = + 50^0$, während 10 ccm *Fehling*scher Lösung beim Kochen mit 7,4 ccm Digistionsgemisch vollständig reduziert wurden.

Das Enzym, dem man den Namen Raffinase beilegen kann, kommt auch, wie *Bourquelot* gezeigt hat, in der Bäckerhefe und in den untergärigen Bierhefen vor. Er digerierte 40 ccm des Auszuges aus diesen Pilzen mit 40 ccm einer 2prozentigen Raffinoselösung

Digitized by Google

eine Stunde bei 45° C. und liefs dann 5 Tage bei Zimmertemperatur unter Ausschlufs einer Infektion stehen. Die Drehung im 200 mm-Rohr war zuerst 2° 4′, nach 20 Stunden hatte sie auf 1° abgenommen, nach 48 Stunden auf 0° 58′. Die Bäckerhefe war etwas wirksamer. Die Reduktion der *Fehling*schen Lösung war etwa die nämliche wie bei dem Aspergillus-Auszug.

Das Vorkommen dieses Enzymes ist auch von *Fischer* und *Lindner* dargethan worden, die es aus den untergärigen Bierhefetypen Frohberg und Saaz, aber nicht aus obergärigen Hefen extrahieren konnten. Sie trockneten die Hefen 9 Tage lang bei 20—25° C., nachdem sie sie vorher einige Zeit auf porösen Thonplatten abgesaugt hatten. Die getrockneten Hefen wurden durch Digerieren in Wasser von 33° C. während 20 Stunden extrahiert. Der Auszug hydrolysierte Melibiose.

Bau hat das Enzym aus untergäriger Frohberghefe extrahiert; er schreibt ihm jedoch nur das letzte Stadium der Hydrolyse zu, die Verwandlung der Meliobiose in Dextrose und Galaktose; er legte ihm infolgedessen den Namen Melibiase bei. *Bau* ist der Ansicht, dafs das erste Stadium der Hydrolyse, die Überführung der Raffinose oder Melitriose in Lävulose und Melibiose durch die Invertase bewirkt wird. Er weicht auch insofern von *Fischer* und *Lindner* ab, als er behauptet, die Melibiase sei unlöslich in Wasser. Das scheint jedoch im Hinblick auf die Eigenschaften der anderen Enzyme sehr unwahrscheinlich.

Melizitase.

Berthelot entdeckte im Jahre 1859 in der Brançon-Manna einen Zucker, den er Melizitose nannte. *Villiers* fand ihn im Jahre 1877 in grofsen Mengen in der Manna von Alhagi maurorum, einer Leguminose von strauchartigem Habitus, die in Persien und in der Bucharei wächst. Das Manna ist eine Ausschwitzung der Blätter und Zweige der Pflanze, die bei heifsem Wetter in der Form von Tropfen auftreten, die an der Luft bald verhärten und durch blofses Schütteln der Zweige gesammelt werden können. Wie Raffinose ist die Melizitose eine Hexatriose von der Formel $C_{18}H_{32}O_{16}$. Sie schmilzt bei 148° C., redu-

Digitized by Google

ziert *Fehling*sche Lösung nicht und besitzt ein Drehungsvermögen $[\alpha]_D = + 88{,}15^0$. Bei der Hydrolyse mit verdünnten Mineralsäuren spaltet sie sich in drei Moleküle Dextrose; hierin gleicht sie etwas der Maltose.

Bourquelot fand, dafs ein Auszug aus Aspergillus niger den Zucker beschränkt hydrolysiert. Er mischte 15 ccm dieses Auszuges mit 15 ccm einer etwa 2,5 prozentigen Melizitoselösung und digerierte das Gemisch 4 Tage lang bei Zimmertemperatur, wobei er es alle paar Stunden auf 50° erwärmte und bei dieser Temperatur einige Minuten hielt. *Bourquelot* wollte durch diese Arbeitsweise die Entwicklung von Mikroorganismen hemmen. Zu Beginn des Versuches betrug die Drehung im 200 mm-Rohr 2° 9'. Nach drei Tagen war sie auf 1° 32' herabgegangen und am Ende des Versuches betrug sie 1° 28'. Die Flüssigkeit reduzierte alsdann *Fehling*sche Lösung.

Die Hydrolyse des Zuckers war nicht vollständig. Das spezifische Drehungsvermögen fiel von $[\alpha]_D = + 88{,}15^0$ auf $[\alpha]_D = + 61{,}2^0$. Die Melizitose war zu Dextrose und einer Hexabiose hydrolysiert worden, die unter dem Namen Turanose bekannt ist, nach folgender Gleichung:

$$\underset{\text{Melizitose}}{C_{18}H_{32}O_{16}} + H_2O = \underset{\text{Dextrose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Turanose.}}{C_{12}H_{22}O_{11}}$$

Die Turanose kann dann weiter zerlegt werden in zwei Moleküle Dextrose, sie gleicht in dieser Hinsicht der Maltose. Das Enzym des Aspergillus, das man Melizitase nennen kann, scheint letztere Umwandlung nicht bewirken zu können, die jedoch durch verdünnte Säuren leicht durchgeführt werden kann.

Laktase.

Der Wert einer Milchdiät hängt zum Teil von dem in der Milch enthaltenen Zucker ab. Dieser, als Laktose oder Milchzucker bekannt, ist ein Glied der Gruppe der Polysaccharide; unter dem Einflufs verdünnter Säuren spaltet er sich in ein Molekül Dextrose und ein Molekül Galaktose. Erst kürzlich hat man gefunden, dafs im Tierkörper ein Enzym enthalten ist, das eine ähnliche Hydrolyse zu bewirken imstande ist und das man infolgedessen Laktase genannt hat. Wir verdanken

Digitized by Google

seine Kenntnis hauptsächlich den Untersuchungen von *Röhmann* und *Lappe*, die es in der Schleimhaut des Dünndarmes der Kälber und Hunde entdeckten. Vor diesen Untersuchungen schrieb man die Umwandlung der Laktose im Darmkanal der Wirkung der Bakterien zu; als Endprodukt der Einwirkung betrachtete man stets die Milchsäure. *Röhmann* und *Lappe* stellten Auszüge aus der Schleimhaut des Dünndarmes her unter antiseptischen Maſsregeln und lieſsen diese Auszüge auf Laktoselösungen einwirken. Nach siebenstündiger Digestion war Dextrose gebildet, die mit Hilfe der Phenylhydrazin-Reaktion nachgewiesen werden konnte. Das dargestellte Osazon gab alle Reaktionen des Dextrosazons. *Röhmann* und *Lappe* fällten das Enzym aus dem Darmauszug auf die gewöhnliche Weise mit Alkohol und fanden, daſs eine Lösung des Auszuges Milchzucker zu hydrolysieren im stande war.

Die Arbeiten von *Röhmann* und *Lappe* wurden bestätigt durch *Pautz* und *Vogel*, die fanden, daſs die Schleimhaut des Leerdarmes von Hunden oder neugeborenen Kindern die Laktose langsam hydrolysiert. *Pregl* fand, daſs die Laktose im Darmsaft des Lammes, dargestellt nach dem *Thiry-Vella*-Verfahren, nicht enthalten ist. *Fischer* und *Niebel* haben ebenfalls beobachtet, daſs die Laktose von Auszügen aus Dünndarmteilen, besonders junger Tiere, hydrolysiert wird.

Der Extrakt aus den *Kephir*-Organismen soll nach *Beyerinck* Laktose hydrolysieren. Er will aus diesen Organismen ein lösliches Enzym isoliert haben, das die nämliche Kraft besitzen soll. Seine Beobachtungen sind von anderen Forschern bestritten worden, die angaben, sein Enzym vermöge wohl Rohrzucker und Raffinose, aber nicht Milchzucker zu spalten. *Fischer* bestätigt *Beyerincks* Behauptung bezüglich der Hydrolyse des Milchzuckers und fügt hinzu, daſs es Rohrzucker ebenfalls hydrolysiert. Auſser aus *Kephir* kann das Enzym nach *Fischer* auch aus gewissen Hefen erhalten werden, wenn man diese bei gewöhnlicher Temperatur trocknet, mit Glaspulver zerreibt und in Wasser suspendiert. Es unterscheidet sich durch gröſsere Beständigkeit von der Glukase, die in einigen anderen Hefen vorkommt.

Digitized by Google

Kapitel X.

Glukosid-spaltende Enzyme.

In den Pflanzen kommen viele Körper von sehr komplexem Charakter vor, die nur eine gemeinsame Eigenschaft besitzen. Wenn sie sich unter dem Einflufs von Mineralsäuren oder Enzymen zersetzen, so liefern sie einen Zucker, gewöhnlich Dextrose, als eines der Einwirkungsprodukte. Die anderen gleichzeitig gebildeten Körper sind untereinander verschieden, einer oder mehrere derselben gehören jedoch zur aromatischen Reihe organischer Verbindungen. Im ganzen sind sie den Polysacchariden nicht unähnlich, die wir schon besprochen haben; während diese jedoch aus untereinander verbundenen Zuckermolekülen bestehen, ist in den Glukosiden der Zucker mit anderen Radikalen verbunden. Weil der darin enthaltene Zucker fast immer Glukose (Dextrose) ist, hat man diese Körper Glukoside genannt. Die am besten bekannten Glieder dieser Gruppe sind das Amygdalin der Mandel und anderer Rosaceen, das Sinigrin der Cruciferen, das Tannin, das im Pflanzenreich so weit verbreitet ist, das Salicin der Weide und das Coniferin der Tannenbäume. Viele andere kommen aber noch in anderen Pflanzen vor.

Die Zersetzung, die sie erleiden, ist im allgemeinen hydrolytischer Art und geht häufig bis zur gänzlichen Zerstörung ihres Moleküls. Manchmal ist sie weniger vollständig und besteht nur in der teilweisen Abspaltung von Zucker, wobei ein weniger komplexes Molekül übrig bleibt. Die letztere Art der Zersetzung ist weniger häufig als die erstere; man kennt sie nur bei einigen Gliedern der Gruppe, besonders beim Amygdalin. Die Mineralsäuren bewirken vollständige Hydrolyse, wie bei den Polysacchariden. Bei diesen kennt man auch die mehr beschränkte Hydro-

Digitized by Google

lyse; z. B. kann ein Glied dieser Gruppe, die Melizitose, wie wir bereits gesehen haben, durch ein Enzym des Aspergillus unter Bildung von Dextrose und Turanose gespalten werden, die letztere schliefslich durch Hydrolyse mit verdünnter Säure in zwei Moleküle Dextrose.

Es wäre zwar zu weitgehend, zu behaupten, dafs für die Zersetzung eines jeden Glukosids ein besonderes Enzym bestehe, sicher ist aber, dafs eine grofse Anzahl solcher Enzyme existiert. Wir kennen das Emulsin, das Amygdalin hydrolysiert, Myrosin, das Sinigrin zersetzt, Erythrozym, das das Glukosid des Krapps spaltet, Rhamnase, die auf Xantho-Rhamnin einwirkt, das man in den Samen der persischen Beeren gefunden hat, und Gaultherase, die ein Glukosid des Salicylsäure-Äthers zersetzt, der in Monotropa hypopythis vorkommt, einem Parasit auf vielen Baumwurzeln. Andere hat man noch in verschiedenen anderen Pflanzen gefunden; man hat sie jedoch noch nicht besonders geprüft.

Emulsin (Synaptase).

Das Glukosid Amygdalin erhielten zuerst im Jahre 1830 *Robiquet* und *Boutron*, die es in krystallinischer Form aus den Samen der bitteren Mandel (Amygdalus communis) darstellten. Sie zeigten, dafs dieser Körper das Ausgangsprodukt der sog. Bittermandel-Essenz ist. Im Jahre 1837 fanden *Liebig* und *Wöhler*, dafs die Umwandlung, bei der letztere auftritt, unter dem Einflufs einer eiweifsartigen Substanz vor sich geht, die auch im Mandelkern vorkommt; dieser Substanz gaben sie den Namen Emulsin. Sie fanden, dafs bei der Einwirkung des Emulsins auf Amygdalin Zucker und Blausäure gebildet wurde. *Robiquet* vermutete im folgenden Jahre, dafs diese Wirkung zu derselben Kategorie gehöre, wie die Einwirkung der Diastase auf Stärke, und gab dem Enzym den Namen Synaptase. Der ältere Name wurde jedoch dafür beibehalten.

Die Zersetzung des Amygdalins durch das Emulsin ist eine Hydrolyse und kann durch folgende Gleichung versinnbildlicht werden:

$$\underset{\text{Amygdalin}}{C_{20}H_{27}NO_{11}} + 2H_2O = \underset{\text{Benzaldehyd}}{C_7H_6O} + \underset{\text{Blausäure}}{HCN} + \underset{\text{Dextrose.}}{2(C_6H_{12}O_6)}$$

Digitized by Google

Aufser Amygdalin spaltet es noch mehrere andere Glukoside, unter anderem Salicin, Helicin, Phloridzin und Arbutin. Die verschiedenen Reaktionen können durch folgende Gleichungen dargestellt werden, wobei jede Reaktion eine Hydrolyse ist:

$$\underset{\text{Salicin}}{C_{13}H_{18}O_7} + H_2O = \underset{\text{Saligenin}}{C_7H_8O_2} + \underset{\text{Dextrose}}{C_6H_{12}O_6}$$

$$\underset{\text{Helicin}}{C_{13}H_{16}O_7} + H_2O = \underset{\text{Salicylaldehyd}}{C_7H_6O_2} + \underset{\text{Dextrose}}{C_6H_{12}O_6}$$

$$\underset{\text{Phloridzin}}{C_{21}H_{24}O_{10}} + H_2O = \underset{\text{Phloretin}}{C_{15}H_{14}O_5} + \underset{\text{Dextrose}}{C_6H_{12}O_6}$$

$$\underset{\text{Arbutin}}{C_{12}H_{16}O_7} + H_2O = \underset{\text{Hydrochinon}}{C_6H_6O_2} + \underset{\text{Dextrose.}}{C_6H_{12}O_6}$$

Emulsin kann nach *Fischer* auch gewisse künstliche Glukoside zersetzen, die er dargestellt hat.

Das Vorkommen von Emulsin ist in mehreren höheren Pflanzen und in gewissen Pilzen beobachtet worden. Unter den ersteren sind am bemerkenswertesten der Mandelbaum und der Kirschlorbeer, die beide zur Ordnung der Rosaceen gehören. Seine Verteilung in diesen Pflanzen ist nicht gleichmäfsig; bei ersterem findet es sich hauptsächlich in den Samen; bei letzterem findet es sich in den jungen Stämmchen und Blättern. Im Jahre 1865 kam *Thomé* zur Ansicht, dafs das Enzym nur in den Samen der bitteren Mandel vorkomme und dort auf das Fibro-Vasalbündel der Kotyledonen beschränkt sei. *Portes* meinte im Jahre 1877, das Emulsin sei auf die Achse des Embryo beschränkt, und Amygdalin sei in den Kotyledonen enthalten. Im Jahre 1887 fand *Johansen* Emulsin in den Samen sowohl der süfsen als auch der bitteren Mandeln, in den Fibrovasalsträngen und den angrenzenden Zellen, hauptsächlich in denen der Kotyledonen. Er fand Amygdalin in dem Parenchym der Kotyledonen der bitteren Mandel allein. Seine Verteilung in diesen Pflanzen und in einigen anderen diesen nahe verwandten hat neuerdings *Guignard* zum Gegenstand eingehendsten Studiums gemacht; dessen Methoden sind teils chemischer Natur, teils gründen sie sich auf gewisse Farbenreaktionen in den das Enzym enthaltenden Zellen. Letztere Methode hat ihre grofsen Schwierigkeiten, und Schlüsse, die aus solchen Reaktionen gezogen werden, müssen mit grofser Vorsicht aufgenommen werden. Wir erinnern blofs an den trüge-

Digitized by Google

rischen Charakter der blauen Reaktion mit Gujaktinktur, die von manchen Forschern als den Enzymen eigentümlich angesprochen wird, von der man aber jetzt weiſs, daſs viele Substanzen sie geben, die gewöhnlich oder häufig in den Pflanzenzellen vorkommen.

Guignard war vorsichtig genug, sich nicht ausschlieſslich auf Farbenreaktionen zur Identifizierung des Enzyms zu verlassen, sondern diese noch durch den chemischen Nachweis zu ergänzen. Seine ersten Versuche wurden mit den Blättern des Kirschlorbeers angestellt. Unter dem Mikroskop konnte er beobachten, daſs in den Geweben dieses Organs, das Amygdalin zu hydrolisieren vermochte, gewisse Zellen, die die Gefäſsbündel umgeben, sich durch die sehr feine Körnung des Protoplasmas auszeichneten, daſs sie auſserdem frei waren von Stärke und Chlorophyll, dagegen eine gewisse Menge Tannin enthielten und eiweiſsreicher als die anderen Blattzellen waren. Er behandelte Schnitte dieses Gewebes mit *Millons* Reagenz, einem Gemisch von Quecksilbernitrat mit Salpetersäure; er stellte dabei fest, daſs alle Blattzellen sich dunkler färbten, fast schwarz, doch war die Färbung am intensivsten in den in Rede stehenden Zellen. Beim Erwärmen der Schnitte verschwand die schwarze Farbe allmählich und ging in orangerot über in den Zellen, in denen man das Enzym vermutete und in schwach-fleischfarben bei dem gewöhnlichen Parenchym. Bei einer verwandten Spezies, Cerasus lusitanica, die Tannin, aber kein Emulsin enthält, entwickelte sich in den entsprechenden Zellen diese orangerote Farbe nicht bei ähnlicher Behandlung. Die Reaktion stammte also nicht vom Tannin, sondern von eiweiſsartigen Körpern, mit denen das Enzym vergesellschaftet ist oder die das Enzym möglicherweise selbst sind. Wahrscheinlich ist der reagierende Körper ein Proteïd, denn die Proteïde geben beim Erhitzen mit *Millons* Reagenz eine sehr ähnliche Reaktion, sie nehmen dabei eine dunkel-ziegelrote Farbe an, was durch vergleichende Versuche festgestellt wurde. Kupfersulfat und Kalilauge färbten diese Zellen violettfleischfarben, wie die in Lösung befindlichen Proteïde, während nur Tannin enthaltende Zellen auf diese Reagentien nicht mehr reagierten als gewöhnliche Parenchymzellen mit ihrer Protoplasma-

Digitized by Google

bekleidung, die sich blafsfleischfarben ohne Beimischung von violett färbten.

Die chemischen Versuche, durch die *Guignard* seine Schlüsse bestätigte, dafs nämlich diese Zellen Emulsin enthalten, bestanden darin, dafs er die Gewebe mit einer Lösung von Amygdalin digerierte. Die in Rede stehenden Zellen kamen in verschiedenen Lagen des Blattes vor, und mit einiger Sorgfalt gelang es *Guignard*, sie von dem anliegenden Gewebe zu trennen. Die Schwierigkeiten einer solchen Trennung waren lediglich mechanischer Art, durch sorgfältiges Arbeiten konnte er sie aber überwinden. In den Blättern und jungen Zweigen des Kirschlorbeers kommen die Zellen in der Endodermis vor, einer die Fibrovasalbündel umgebenden Scheide, die jedoch zur Rinde gehört, deren innerste Schicht sie bildet. Wenn diese Scheide unter dem Mikroskop sorgfältig herausgeschnitten wurde, das Gewebestück im Uhrglas in eine Lösung von Amygdalin gelegt und bei 50° C. gehalten wurde, so wurde das Glukosid schnell zersetzt; die Zersetzung machte sich bemerkbar durch das Auftreten des Geruches nach Benzaldehyd und Blausäure, beides, wie wir gesehen haben, Produkte der Hydrolyse. Schnitte, die durch das Blatt gemacht wurden, riefen die gleiche Zersetzung hervor, wenn sie Teile der endodermalen Scheide enthielten, sonst aber nicht.

Mit Hilfe dieser Methoden stellte *Guignard* fest, dafs das Emulsin des Kirschlorbeers in der Endodermis vorkommt; in der Mandel wurde es in der Achse des Embryos in dem vielschichtigen Pericykel direkt unterhalb der Endodermis und dicht um die Gefäfsbündel aufgefunden. In den Kotyledonen befindet es sich sowohl in der Endodermis, als auch in dem Perycykel. Das Enzym kommt sowohl in den süfsen als auch in den bitteren Mandeln vor, obwohl letztere kein Amygdalin enthalten.

Wahrscheinlich kommen das Glukosid und das Enzym nicht in derselben Zelle vor, da die Zersetzung des ersteren in dem Samen der Mandel nur während der Keimung vor sich geht. Die Verteilung des Amygdalins kennt man jedoch nicht genau. Es ist wahrscheinlich, dafs der fliefsende Saft, in dem es enthalten ist, längs der Zellgewebe der Axe der Pflanze wandert, und da das Enzym, welches das Glukosid zersetzt, sich in der unmittelbaren Nachbarschaft des Bastes befindet, der ein grofses

Digitized by Google

leitendes Gewebe für Stoffwechselprodukte ist, so ist es nicht unwahrscheinlich, dafs die Zersetzung des Glukosids während seiner Wanderung längs der Axe stattfindet infolge seiner Diffusion in die Emulsin führenden Zellen, so dafs letzteres die Aufgabe hat, aus dem Amygdalin gewisse Nährstoffe, hauptsächlich Zucker, zu bilden, die von dort aus leicht ihren Weg zu den leitenden Geweben nehmen und so zu den wirklichen Stellen des aufbauenden Stoffwechsels wandern können. Andererseits ist es auch möglich, dafs das Amygdalin durch das leitende Gewebe des Bastes heruntersteigt und auf seinem Wege nach unten zersetzt wird, indem das Emulsin in den Bast diffundiert, obgleich dies weniger wahrscheinlich erscheint, da *Guignard* niemals das Emulsin aufserhalb der Zellen fand, in denen es nach seiner Ansicht gebildet ist.

Die Wahrscheinlichkeit, dafs das Enzym und das Glukosid in verschiedenen Zellen gebildet werden, ist von keinem Geringeren als *Pfeffer* bestritten worden, der behauptet, dafs sie beide in denselben Zellen vorkommen und dafs die einzige Trennung darin bestehe, dafs das Enzym in dem Protoplasma enthalten und das Glukosid im Zellsaft gelöst sei. Diese Ansicht harmoniert jedoch nicht mit *Guignards* Versuchen.

Aufser in den bis jetzt erwähnten Pflanzen, die alle zu den Rosaceen gehören, fand *Guignard* das Emulsin in verschiedenen brasilianischen Arten des Genus Manihot, das zu den Euphorbiaceen gehört. Bei diesen kommt das Enzym in dem Milchgefäfs-System des Embryo vor.

In neuerer Zeit hat sich herausgestellt, dafs das Emulsin unter den Pilzen weit verbreitet ist. Es wurde fast gleichzeitig im Jahre 1893 von *Gérard* im Penicilium glaucum und von *Bourquelot* im Aspergillus niger gefunden. *Bourquelot* züchtete den letzteren Pilz in *Raulins* Nährflüssigkeit bis zur Sporenbildung. Dann wurde die Flüssigkeit abgegossen, der Pilz mehrere Male mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Wasser mehrere Tage lang maceriert. Das Filtrat enthielt alsdann ein Gemenge von Enzymen, darunter auch Emulsin. Ein klein wenig davon zu einer Amygdalinlösung gesetzt und in der Wärme digeriert, entwickelte innerhalb einer Stunde den charakteristischen Geruch nach Bittermandelöl.

Digitized by Google

Bourquelot studierte die Wirkung dieses Enzyms auf mehrere andere Glukoside; er fand, dafs einige davon hydrolysiert wurden, aber nicht alle. Er gab folgende Versuchsreihen bekannt.

10 ccm einer wässerigen Lösung mit 0,2 g Salicin wurden mit 10 ccm Aspergillus-Auszug versetzt und 40 Stunden bei 23° C. gehalten. Am Ende dieser Zeit waren 55% des Salicins zersetzt.

Zu 10 ccm Aspergillus-Auszug wurden 0,2 g Coniferin zugefügt. Da dieses Glukosid in Wasser kaum löslich ist, so blieb die Flüssigkeit trübe; das Coniferin war darin nur suspendiert. Die Digestion wurde bei 23° C. 30 Stunden lang durchgeführt und dann noch 3 Tage bei 45° C. Während dieser Zeit wurde die Flüssigkeit immer weniger trübe, bis sie zuletzt ganz klar wurde. Etwas später wurde sie milchig; es bildete sich ein neuer Niederschlag, der sich absetzte und bis zum Ende des Versuchs zunahm.

Bei Schlufs der Digestion enthielt die Flüssigkeit 0,093 g Dextrose, annähernd so viel als 0,2 g Coniferin bei der vollständigen Hydrolyse zu liefern im stande sind. Der am Schlufs sich bildende Niederschlag war Coniferyl-Alkohol, der sich bei der Hydrolyse gebildet hatte und der, ähnlich dem Conferin, fast unlöslich in Wasser ist.

Bourquelot und *Hérissey* fanden, dafs das Emulsin des Aspergillus aufser Amygdalin, Salicin und Coniferin auch noch Phloridzin, Arbutin, Aeskulin, Helicin und Populin hydrolysieren kann, dagegen nicht Solanin, Hesperidin, Convallamarin, Digitalin und Jalapin.

Die Ergebnisse, die *Gérard* mit Penicillium erhalten hatte, ähnelten denen *Bourquelots* sehr. Er stellte sein Enzym dar durch Auslaugen des Pilzes in Wasser und Konzentrieren des Auszugs auf eine kleine Menge im Vakuum. Aus dieser Lösung wurde dann das Emulsin mit Alkohol gefällt. Es hydrolysierte, wie er feststellte, Amygdalin und Salicin.

Bourquelot hat Emulsin in noch vielen anderen Pilzen aufser den bereits erwähnten gefunden. Es ist nicht auf saprophytische Formen beschränkt, sondern existiert auch in einer grofsen Anzahl Parasiten, unter denen ganz besonders der Polyporus hervorgehoben sein mag. Im ganzen untersuchte er 43 parasitische Pilze und fand in 34 Emulsin. Die meisten derselben befallen

Digitized by Google

lebende Bäume, insbesondere das alte Holz. Es ist wohlbekannt, dafs die Rinde, das Cambium und selbst die holzigen Teile der Bäume Glukoside enthalten. Das Vorkommen des Enzyms in den Pilzen scheint in einiger Beziehung zu den Eigentümlichkeiten ihres Parasitismus zu stehen.

Kürzlich hat *Hérissey* Emulsin in mehreren Flechten gefunden, unter denen Usnea barbata, Physicia ciliaris, Parmelia caperata und zwei Arten von Ramalina genannt sein mögen. Er zerkleinerte die Flechten und brachte etwa $^1/_2$ g davon 2—3 Tage lang bei 35° C in Berührung mit einer Lösung von Amygdalin. Am Ende dieser Zeit war sowohl Blausäure als auch Zucker vorhanden.

Es ist noch zweifelhaft, ob das Emulsin im tierischen Organismus vorkommt. *Kölliker* und *Müller* haben nachgewiesen, dafs der Pankreassaft Amygdalin zersetzen kann, ein spezifisches Enzym haben sie jedoch nicht nachgewiesen.

Das Emulsin wirkt am energischsten bei Temperaturen zwischen 30 und 40° C.; über diese Temperatur hinaus nimmt seine Wirkung allmählich ab, es wird aber erst nahe bei 80° C. zerstört. Es arbeitet am besten in neutralen Lösungen, seine Wirksamkeit wird jedoch weder durch kleine Säuremengen, noch durch kleine Mengen Alkali wesentlich gehemmt.

Myrosin.

Dieser Körper ist das charakteristische Enzym der Cruciferen; es wurde zuerst von *Bussy* entdeckt. Es ist nicht nur bei den Cruciferen weit verbreitet, sondern es kommt auch in einigen andern nahe verwandten Ordnungen vor. Es wirkt hauptsächlich auf die Glukoside Sinigrin oder myronsaures Kalium, das dabei in Schwefelcyanallyl, das flüchtige Öl des Senfes, Dextrose und saures schwefelsaures Kalium zersetzt wird, gemäfs der Gleichung:

$$\underset{\text{Sinigrin}}{C_{10}H_{18}NKS_2O_{10}} = \underset{\text{Schwefelcyanallyl (Senföl)}}{C_3H_5CNS} + \underset{\text{Dextrose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{saures schwefelsaures Kalium}}{KHSO_4}$$

Es ist bemerkenswert, dafs die Zersetzung des Glukosides scheinbar nicht von einer Wasseraufnahme begleitet ist, so dafs

Digitized by Google

man eigentlich nicht gut von einer Hydrolyse sprechen kann, wie in allen anderen bislang beobachteten Fällen.

Behandelt man die gequetschten Samen des schwarzen Senfes, Sinapis (Brassica) nigra mit Wasser, so macht sich bald der Geruch des Senföles wahrnehmbar. Die Samen enthalten sowohl das Myrosin, als auch das Glukosid, jedoch in getrennten Zellen; bringt man sie durch das Lösungsmittel in Berührung, so beginnt die Reaktion.

Das Sinigrin kann aus den Samen des schwarzen Senfes in folgender Weise dargestellt werden, die eine Modifikation der *Bussy*schen Methode ist. Ein Kilogramm der gepulverten Samen wird mit 1,5 Liter Alkohol von 82 % ausgezogen, der Alkohol wird dann auf 1250 ccm eingedampft. Der Rückstand wird heifs ausgeprefst und wiederum mit Alkohol ausgekocht. Nach dem Abgiefsen des Spiritus wird abgeprefst, der Rückstand bei 100° C. getrocknet und 12 Stunden mit seinem dreifachen Volumen kalten Wassers digeriert. Das Wasser wird dann dekantiert und der Rückstand mit dem zweifachen Volumen Wasser digeriert. Die beiden wässerigen Lösungen werden nach Zusatz einer kleinen Menge von Baryumkarbonat zur Syrupskonsistenz eingedunstet. Dieser Syrup wird dann mit kochendem Alkohol von 85 % erschöpft, der das Sinigrin löst. Nach der Filtration destilliert man den Alkohol ab, und das Glukosid krystallisiert aus.

Die Verbreitung des Myrosins hat *Guignard* durch weitläufige Untersuchungen erforscht; er fand es in den Pflanzenordnungen der Cruciferen, Capparidaceen, Resedaceen, Tropaeolaceen, Limnanthaceen und Papayaceen. Im Jahre 1886 zeigte *Heinricher*, dafs bei vielen Cruciferen verschiedene Zellen, die sehr verschiedenartig verteilt waren, sich durch ihren besonderen Inhalt auszeichneten. Sie geben ganz bestimmte Eiweifsreaktionen und infolgedessen betrachtete er sie als Reserve-Eiweifs-Lager. *Guignard* fand ähnliche Zellen sehr oft in allen oben erwähnten Ordnungen und zwar auf Grund ähnlicher Reaktionen, wie er sie zum Nachweis des Myrosins in den Zellen des Kirschlorbeers und der Mandel angewandt hatte. Sie sind leicht kenntlich an ihrem feinen körnigen Inhalt und an dem Fehlen der Stärke, des Chlorophylls, der Aleuronkörner, obwohl sie an verschiedenen Stellen zwischen anderen Zellen liegen, welche einen oder

Digitized by Google

mehrere dieser Bestandteile enthalten. Wird das Gewebe, in dem sie liegen mit *Millons* Reagens behandelt und erwärmt, so färben sich diese Zellen orangerot, während das Parenchym, in das sie eingebettet sind, sich nur schwach fleischfarben färbt. Mit Kupfersulfat und Kalilauge färben sie sich violettrot. Diese Zellen enthalten, vergesellschaftet mit ihrem Protoplasma, eine Menge amorpher Eiweifssubstanz, die mit Alkohol koaguliert und sich dann von dem peripherischen Protoplasma in der Form grobkörniger Massen trennt, die bei der darauf folgenden Behandlung mit *Millons* Reagens sich lebhafter rot färben als das Protoplasma. Die Zellen können von dem Parenchym, in dem sie liegen, durch Färben mit Methylgrün und anderen Anilinfarben unterschieden werden. Gewöhnlich sind sie etwas gröfser, länglicher und weniger regelmäfsig als die umgebenden Zellen.

Guignard fand, dafs die Kraft verschiedener sorgfältig herausgeschnittener Gewebestücke, das Sinigrin zu zersetzen, sich nach der Anzahl derartiger in dem Gewebe enthaltenen Zellen richtete. Das Myrosin scheint darin mit der Eiweifssubstanz vergesellschaftet zu sein, gerade wie dies bei dem Emulsin der Fall ist. Man konnte die Anwesenheit von Myrosin in diesen Zellen sehr leicht bei dem Goldlack nachweisen, in dem sie eine leicht trennbare Schicht des Pericykels bilden. Wurde dieses sorgfältig isoliert und mit einer 2prozentigen Sinigrinlösung erwärmt, so trat der charakteristische Geruch nach Senföl sofort auf. *Guignard* fand bei seinen Untersuchungen, dafs jedes Gewebe, welches diese Zellen enthielt, die Zersetzung bewirken kann, dafs jedoch bei Abwesenheit der Zellen das Gewebe ohne Wirkung auf das Glukosid ist.

Die Ergebnisse der *Guignard*schen Untersuchungen über die Verteilung dieser Zellen in den Pflanzen der verschiedenen namhaft gemachten Ordnungen können kurz wie folgt zusammengefafst werden:

Wurzeln. Hauptsächlich in der Rinde, selten im Holz. In fleischigen Wurzeln ist das Gewebe, welches das Holz vertritt, meistens parenchymartig und enthält sie. In holzigen Wurzeln finden sie sich sowohl im sekundären Bast als auch in der Rinde und in geringerem Mafse in den Markstrahlen. Bei den Capparidaceen enthält das Holz keine, im Mark finden sich aber einige.

Digitized by Google

Bei den Resedaceen kommen sie nicht weiter nach innen als im Bast vor. Bei den Papayaceen ist die Wurzel nicht sehr reich an Myrosin.

Stämme. Hier ist die Verteilung bei den verschiedenen Arten sehr mannigfaltig. Im allgemeinen sind das Pericykel und die davon abstammenden Gewebe am enzymreichsten, während der sekundäre Bast erst in zweiter Linie in Betracht kommt. Wenn die Zellen im Holz vorkommen, so liegen sie gewöhnlich in den Markstrahlen, das Mark selbst enthält auch einige davon. *Guignard* erkannte 9 Typen der Verteilung in den Stämmen der Cruciferen:

1. Das Pericykel allein. Lepidium sativa und andere.
2. Das Pericykel und der primäre und sekundäre Bast. Erysimum cheiranthoïdes.
3. Die Wurzel hauptsächlich, in geringem Mafse das Pericykel. Moricandia hesperidiflora.
4. Die Rinde und der Bast unter einem dünnen und sclerenchymatösen Pericykel. Iberis amara und andere.
5. Die Rinde, das Pericykel und das Mark. Nasturtium officinale und andere.
6. Die Rinde, das Pericykel und der sekundäre Bast. Bunias orientalis und andere.
7. Die Rinde, das Pericykel, der sekundäre Bast und das Mark. Raphanus sativus und andere.
8. Die Rinde und hauptsächlich das Pericykel; auch der primäre und sekundäre Bast und das Mark. Brassica nigra und andere.
9. Die Rinde, das Pericykel, der primäre und sekundäre Bast, das Holzparenchym und das Mark. Cochlearia armoracea und andere.

Die Verteilung in den anderen aufgeführten Familien ist eine ähnliche, mit Ausnahme der Papayaceen, deren Stengel nur wenig Myrosin enthalten. Bei den Limnanthaceen liegen die besonderen Zellen hauptsächlich in der Rinde, aber einige finden sich auch im Bast. Bei den Tropäolaceen bilden sich im allgemeinen Zellgruppen oder Zellknoten in der hypodermalen Schicht der Rinde, einige finden sich im Bast.

Blätter. Die Arten, die viele von den Myrosin ausscheidenden Zellen in der Achse der Pflanze enthalten, zeigen sie gewöhnlich

Digitized by Google

in den Blättern und die relative Menge ist dort oft am gröfsten. Sie kommen im ganzen Mesophyll vor, am zahlreichsten aber gewöhnlich nach der unteren Oberfläche hin. In einigen Blättern sind sie auf das Mesophyll und das Pericykel beschränkt, bei anderen hauptsächlich auf das Pericykel und den Bast der Adern. In einigen Fällen kommen sie in der Endodermis der Gefäfsbündel vor. Bei den Capparidaceen finden sie sich zu zwei und drei durch das Parenchym hindurch zusammen. Bei den Limnanthaceen finden sie sich hauptsächlich in der Epidermis der unteren Oberfläche. Sie sind sehr lang im Vergleich zu ihrer Breite und sehen fast röhrenförmig aus; oft liegen zwei und auch mehr nebeneinander. Bei den Papayaceen unterscheiden sich verschiedene Arten in ihrem Gehalt an Myrosin. Eine beträchtliche Menge enthalten die Blätter von Carica condinamarcensis und Vasconcella quercifolia; die Zellen finden sich hauptsächlich in der Blattspreite (Lamina).

Blüten. Bei den Capparidaceen enthalten die Blüten eine grofse Anzahl der secernierenden Zellen, sowohl in den Kelchblättern, als auch in den Blumenblättern. Sie sind sehr zahlreich in der Wand des Ovariums. Bei dieser Ordnung kommen sie hauptsächlich in kleinen Gruppen vor, von denen jede aus einer einzelnen Zelle entwickelt wird, die sichtbar wird, wenn das Gewebe noch sehr jung ist. Bei Tropäolum sind sie vorwiegend in dem Gewebe des Sporns. In den Blüten der Cruciferen findet man sie hauptsächlich in den Fruchtblättern, wo sie in der Nachbarschaft der Fibrovasalbündel liegen.

Samen. Bei den Cruciferen ist die Verteilung der secernierenden Zellen verschieden; entweder finden sie sich in den Integumenten allein, oder in diesen und in dem Embryo. *Guignard* unterscheidet 5 Arten der Verteilung:

1. Das Parenchym der Kotyledonen und die Rinde der Achse des Embryos.

2. Das hinten an die Fibrovasalbündel der Cotyledonen angrenzende Gewebe, oder das Pericykel, wenn diese Schicht ausgebildet ist; auch die Rinde der Achse.

3. Beide unter 1. und 2. beschriebene Regionen.

4. Manchmal fehlen sie in der Wurzel und in den Kotyledonen.

Digitized by Google

5. Die Integumente allein.

Bei den Limnanthaceen können diese Zellen in dem Parenchym der Kotyledonen beobachtet werden, wenn der Samen noch sehr jung ist und ehe Reservestoffe in den Zellen abgelagert wurden. Später, bei der Keimung der Samen, können sie in der unteren Epidermis beobachtet werden, wenn die Kotyledonen ergrünen. Die anderen Ordnungen aufser den Papayaceen weisen eine ähnliche Verteilung auf. Bei diesen ist das Myrosin fast ausschliefslich auf das äufsere Integument beschränkt, das eine dünne, in Berührung mit Wasser aufserordentlich aufschwellende Haut bildet. Es ist noch nicht sicher, ob ein Enzym in der inneren Schicht der Samenkapsel abgeschieden wird.

Im Milchgang der Papayaceen findet sich kein Myrosin.

Aufser in diesen Pflanzen fand *Guignard* das Myrosin in mehreren Arten von brasilianischem Manihot. Es ist aber dort nicht in dem Milchgefäfs-System lokalisiert wie das Emulsin.

Obwohl die Wirkung des Myrosins hauptsächlich im Hinblick auf die Zersetzung des Sinigrins studiert worden ist, so spaltet es doch auch Sinalbin, das Glukosid des weifsen Senfes, Brassica alba, und es erscheint nicht zweifelhaft, dafs es alle in dieser so hervorragenden Pflanzenklasse vorkommenden Glukoside zu zersetzen vermag. Diese ähneln sich sehr hinsichtlich ihrer Zersetzungsprodukte, doch variiert in den einzelnen Fällen das aromatische Molekül.

Guignard hat Untersuchungen über die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Myrosins angestellt und gefunden, dafs es mit den andern Enzymen manche Eigenschaft gemein hat. Er gewann das Enzym einmal aus dem äufseren Integument des Samens von Carica papaya und ein andermal aus dem Auszug aus den gemahlenen Samen von weifsem Senf. In beiden Fällen war das Enzym fast identisch.

Die äufsere Haut des Samens von Carica kann leicht von dem übrigen Teil getrennt werden. Sie schwillt in Wasser beträchtlich auf und nimmt eine fast schleimige Beschaffenheit an. Die innere Haut ist hart und sclerenchymatös, so dafs die äufsere Haut leicht davon getrennt werden kann. Die Zellen der äufseren Haut enthalten aufser dem Myrosin kaum noch etwas anderes, und man kann ein ziemlich reines Präparat des Enzyms erhalten,

Digitized by Google

wenn man diese Schicht zum Schwellen bringt, sie von der inneren Haut trennt, trocknet und pulvert. Eine sehr kleine Menge dieses Pulvers genügt zur Zersetzung des Glukosides.

Guignard stellte es aus dem weifsen Senf dar, indem er eine Anzahl Samen zerkleinerte und mehrere Stunden in Wasser von 40° C. einteigte. Das von dem Teig gewonnene Filtrat wurde dann auf 70° C. erhitzt, wobei der gröfsere Teil der Eiweifsstoffe koagulierte, die abfiltriert wurden. Das Myrosin wurde alsdann durch das doppelte Volum 90 prozentigen Alkohols abgeschieden, abfiltriert, auf einem Wasserbad bei 30° C. getrocknet und zum Schlufs mit Äther gewaschen.

Bei seinen Versuchen über die Eigenschaften des Myrosins benutzte *Guignard* beide Präparate nebeneinander.

Das Enzym zeichnete sich dadurch aus, dafs es der zerstörenden Wirkung höherer Temperaturen widerstand. In einer Reihe von Röhrchen wurden 5 ccm des Extraktes der Samen von Carica oder Senf und 5 ccm Wasser gegeben, dann wurden sie auf dem Wasserbad ganz allmählich erhitzt. Von 50° C. ab bis 85° C. wurde bei jedem Grad eine Probe weggenommen. Die Röhrchen wurden alsdann abgekühlt; zu jedem wurden hierauf 0,02 g Sinigrin gegeben, dann wurden sie bei Zimmertemperatur 18 bis 24 Stunden digeriert. Die Frage, ob das Enzym noch imstande war, das Glukosid zu zersetzen, wurde darnach entschieden, ob der Geruch nach Senföl auftrat oder nicht. Es stellte sich heraus, dafs das Enzym durch Erhitzen auf 81° C. in seiner Wirksamkeit nicht geschädigt wurde; über diese Temperatur hinaus wurde das Enzym teilweise, bei 85° C. gänzlich zerstört. Die Kurve, die die Wirkung bei verschiedenen Temperaturen darstellte, zeigte demgemäfs einen sehr raschen Fall zwischen 81 und 85° C., einen Fall, wie man ihn so schroff bei keinem anderen bisher untersuchten Enzym gefunden hat. Die Höchsttemperatur, bei der das Enzym gänzlich zerstört wird, liegt nahe bei der von *Kjeldahl* für die Diastase angegebenen, welche 86° C. beträgt, ist aber beträchtlich höher als die für die Invertase, welche 70° C. beträgt.

Salicylsäure schadet, wenn ihre Mengen nicht über 1% beträgt, der Wirkung des Myrosins nicht; 1,5% schwächt sie ganz beträchtlich, und bei Gegenwart von 2% ist das Enzym gänzlich

Digitized by Google

wirkungslos. Die Diastase wird von der Salicylsäure in ganz ähnlicher Weise beeinflufst.

Die Gegenwart von 1% Tannin unterbindet nahezu die Wirkung, sowohl von Myrosin, als auch von Emulsin. Bei höherer Temperatur, z. B. bei 80° C., ist die hemmende Wirkung des Tannins viel gröfser; es genügen alsdann 0,05%, um die Zersetzung des Glukosids vollständig zu hemmen.

Chloral hat viel weniger Einflufs auf die Wirkung beider Enzyme; es ist dies überraschend, da sich dieses Reagens sehr energisch mit Eiweifsstoffen verbindet. *Guignard* brachte in eine Reihe von Röhrchen je 5 ccm Auszug aus der Testa der Samen von Carica, 5 ccm Wasser und 0,02 g Sinigrin; zu den einzelnen Röhrchen der Versuchsreihe fügte er alsdann allmählich wachsende Mengen Chloral und digerierte sie bei 40° C. Er fand, dafs das Röhrchen mit 1% Chloral in 15 Minuten einen starken Geruch nach Senföl entwickelte; bei 2% wurde viel weniger entwickelt und bei 3% Chloral war der Geruch nach dieser Zeit gerade eben noch wahrnehmbar; mit 4% entwickelte sich der Geruch erst nach 30 Minuten und mit 5% konnte eine Wirkung erst nach Ablauf von einer Stunde beobachtet werden. Eine darauffolgende zwölfstündige Digestion erhöhte die Intensität des Geruches nicht. Wurde ein Röhrchen mit 1% Chloral zwei Minuten auf 80° C. erhitzt, so wurde das Enzym zerstört; die Temperatur allein war ohne Wirkung auf das Enzym.

Thonerde und Borax, die antiseptische Eigenschaften haben, übten nur geringen Einflufs auf das Myrosin aus; Mengen von weniger als 6—8% waren unschädlich.

Erythrozym.

Ein drittes Enzym, welches ein Glukosid zu spalten vermag, wurde von *Schunck* im Jahre 1852 in der Wurzel der Krapppflanze (Rubia tinctoria) entdeckt. Ganz im Gegensatz zu den anderen bisher beschriebenen Enzymen hat es eine nur sehr beschränkte Verbreitung und wirkt nur auf ein einziges Glukosid. Letzteres nannte *Schunck* Rubian, es wurde von ihm zwei Jahre früher entdeckt. Er fand, dafs beim Eintragen des Rindengewebes in Wasser ein Körper in Lösung ging, der auf Zusatz von Zinnchlorid oder Bleiacetat einen schön purpurnen Niederschlag

Digitized by Google

lieferte. Wenn man diesen Niederschlag durch Filtration trennt, ihn dann in Wasser suspendiert und einen Strom Schwefelwasserstoff hindurchleitet, so reifst das sich ausscheidende Schwefelzinn einen Teil des Farbstoffes nieder, der andere Teil bleibt in Lösung. Das Gemisch der beiden wurde früher von *Kuhlmann* als einheitlicher Farbstoff unter dem Namen Xanthin beschrieben.

Das Gemisch von Schwefelzinn mit Farbstoff gab nach dem Auswaschen mit kaltem Wasser beim Auskochen mit Alkohol den Farbstoff ab, der mit gelber Farbe in Lösung ging. Beim Erwärmen schied er sich daraus ab; *Schunck* nannte ihn Rubian. Bei der Hydrolyse mit verdünnten Säuren kehrte die prachtvoll rote Farbe wieder; es hatte sich, wie sich herausstellte, Alizarin gebildet; Glukose und andere Körper komplexer Zusammensetzung fanden sich ebenfalls in der Lösung.

Das Enzym, ebenso das Glukosid, wurden aus einem wässerigen Auszug aus der Krappwurzel dargestellt. Letztere wurde gemahlen, auf feinem Kannevas ausgebreitet und mit viel destilliertem Wasser ausgezogen. Während des Prozesses wurde die Temperatur der Flüssigkeit auf 38° C. gehalten. Der wässerige Auszug wurde zu der gleichen Menge Alkohol gesetzt, worauf sich ein braunflockiger Niederschlag abschied. Dieser wurde durch Dekantation getrennt, auf einem Filter mit Alkohol gewaschen, bis dieser keine färbende Substanz mehr löste. Auf dem Filter verblieb alsdann eine rötlichbraune Masse.

Dieses Rohmaterial enthielt das Enzym, gemischt mit verschiedenen Pektinstoffen und wahrscheinlich etwas Pektase, einem besonderen Enzym, das in einem späteren Kapitel behandelt werden wird.

Fügte man etwas von diesem Rohmaterial zu einer Lösung von Rubian und liefs bei gewöhnlicher Temperatur einige Stunden stehen, so gestand die Flüssigkeit zu einer Gallerte von hellbrauner Farbe; sie war geschmacklos und unlöslich in Wasser. Nach einigem Stehen nahm Wasser keinen Farbstoff mehr daraus auf. *Schunck* bezeichnete diesen Punkt als Endpunkt der Reaktion. Die Flüssigkeit blieb neutral, und es entwickelte sich kein Gas. Die Gallerte entstand aller Wahrscheinlichkeit nach aus der Wirkung der Pektase auf gewisse Bestandteile des Auszuges, wie wir

Digitized by Google

später sehen werden. Aufserdem enthielt aber der Extrakt gewisse Substanzen, die aus dem Rubian gebildet waren. Durch geeignete Behandlung schied *Schunck* daraus Alizarin ab, die Purpursubstanz, die aus dem Rubian durch Einwirkung von Säuren entsteht, ferner Verantin und Rubiretin, sowie Körper harziger Natur, Rubiafin, Rubiagin und Rubiadipin, letzteres ein Körper von Fettnatur. Das Wasser, mit dem die Gallerte gewaschen worden war, enthielt Dextrose und gewisse Pektinstoffe.

Die Zersetzung war allem Anschein nach sehr komplexer Natur, denn unter verschiedenen Versuchsbedingungen wechselten die Reaktionsprodukte sehr. Unter den beschriebenen Bedingungen bildeten sich am meisten Zucker, Rubiafin und Rubiagin, am wenigsten Alizarin; dazwischen lag die Menge des Rubiretin und Verantin. Wurde einem in der Umwandlung begriffenen Gemisch eine Spur Schwefelsäure zugesetzt, so bestand die Hauptmenge des Reaktionsproduktes aus Rubiretin und Verantin, auch etwas Alizarin und Rubiagin wurde gebildet. Wurde die Flüssigkeit anstatt sauer unter Benutzung kleiner Mengen Soda alkalisch gemacht, so wurde eine grofse Menge Rubiafin und über den Durchschnitt Alizarin, eine mäfsige Menge Rubiretin und Verantin, aber kein Rubiafin gebildet. Ein Überschufs von kaustischem Alkali hatte dieselbe Wirkung wie verdünnte Schwefelsäure. Je mehr die Wirkung durch irgend einen Einflufs verzögert wurde, um so mehr Rubiretin und Verantin, und um so weniger Alizarin wurde gebildet.

Aus seinen unter verschiedenen Gesichtspunkten unternommenen Versuchen schlofs *Schunck*, dafs die Zersetzung drei Anteile Rubian erfordere. Der erste Anteil verlor Wasser und bildete Alizarin. Der zweite verlor ebenfalls Wasser, bildete jedoch Rubiretin und Verantin in gleichem Verhältnis. Der dritte Anteil allein wurde wirklich hydratisiert, wobei er unter Wasseraufnahme Zucker und Rubiafin bildete, oder mit mehr Wasser Rubiagin. Das Rubiadipin fand er in sehr kleiner Menge, und er hält sowohl seinen Ursprung, als auch seine Natur für sehr unsicher. *Schunck* führt alle diese Wirkungsweisen auf den Einflufs des Enzyms zurück, welches er Erythrozym nannte.

Dieses Enzym ist unlöslich in Wasser, bleibt jedoch in demselben suspendiert und kann dauernd durch Zusatz von Bleiace-

Digitized by Google

tat oder Quecksilberchlorid gefällt werden. Seine Wirksamkeit wird durch Erhitzen mit Wasser auf 100° C. zerstört.

Erythrozym ist wahrscheinlich verwandt mit Emulsin, denn letzteres ist auch von beschränkter Wirkung auf Rubian. *Schunck* benutzte ein Emulsinpräparat aus bitteren Mandeln, erhalten durch Fällung des wässerigen Auszuges mit Alkohol, nach Entfernung des darin enthaltenen Öles. Er fand, dafs Emulsin aus Rubian Alizarin, Verantin und Rubiretin bildete, das Alizarin sogar in gröfserer Menge als es Erythrozym bildet. Über die Anwesenheit von Rubiafin, Rubiagin oder Glukose in seinen Emulsin-Digestionen macht er keine Mitteilungen.

Schunck ist der Ansicht, dafs beide Enzyme mit einander verwandt sind, das Erythrozym aber die stärkste Wirkung besitzt.

Rhamnase.

Ein viertes Enzym, das ebenfalls zu dieser Gruppe gehört, hat noch eine viel begrenztere Verbreitung. Es kommt in den Samen von Rhamnus infectorius, der sogenannten Persischen Beere vor, deren Früchte eine prächtige gelbe Farbe liefern. Dieses Enzym, das man Rhamnase nennen kann, ist von *Marshal Ward* und *Dunlop* untersucht worden. Die Früchte enthalten ein Glukosid, bekannt unter dem Namen Xanthorhamnin, dem die Formel $C_{48}H_{66}O_{29}$ zukommt. Bei seiner Zersetzung liefert es Rhamnetin oder Rhamnin und Dextrose. Wenn das Fleisch der Früchte oder ein Auszug aus dem Perikarp mit einem Auszug aus den Samen kurze Zeit bei 35° C. digeriert wird, so fällt ein gelber Niederschlag aus, der aus Rhamnin besteht; der Zucker bleibt in Lösung. Ein Aufkochen des Samenauszuges zerstört seine Fähigkeit, den Niederschlag zu bilden. Sehr sorgfältige histologische Untersuchungen haben gezeigt, dafs das Enzym auf die Nuht der Früchte beschränkt ist, die aus parenchymatischen Zellen besteht und eine glänzende, ölartige, farblose Substanz enthält. Die Zellen zeigen zwei bis drei grofse Vakuolen, in denen einige glänzende Körnchen beobachtet werden können. Wenn die Verfasser auf eine Lösung von Xanthorhamnin aus dem Perikarp der Frucht ein klein wenig von der Nuhte des Samens aufstreute, so wurde die Wirkung der Rhamnase in einigen

Digitized by Google

Minuten sichtbar. In 10 Minuten war das schwimmende Gewebestück mit einem goldgelben Niederschlag der färbenden Substanz bedeckt; in 20 Minuten sanken Wolken desselben Niederschlags durch die Lösung, und nach Ablauf von kaum einer Stunde war der Boden des Gefäfses mit einem nahezu 2 mm hohen Bodensatz bedeckt.

Die Rhamnase ist nur in der angeführten Pflanze entdeckt worden.

Gaultherase (Betulase).

Das fünfte Enzym dieser Gruppe, von dem wir Notiz nehmen müssen, ist von *Schneegans* und von *Bourquelot* untersucht worden. Von ersterem wurde es in der Rinde von Betula lenta beobachtet und mit dem Namen Betulase belegt. *Bourquelot* fand es unabhängig hiervon in mehreren Pflanzen, unter anderem in Monotropa hypopythis, Gaultheria procumbens, Spiraea Ulmaria, S. Filipendula und in mehreren Arten von Polygala. Es hydrolysiert Gaultherin unter Bildung von Methylsalicylat (Wintergrünöl) und Dextrose nach folgender Reaktion:

$$\underset{\text{Gaultherin}}{C_{14}H_{18}O_8} + H_2O = \underset{\text{Methylsalicylat}}{C_6H_4OHCOOCH_3} + \underset{\text{Dextrose}}{C_6H_{12}O_6}$$

Bourquelot nannte das Enzym Gaultherase nach dem Namen des Glukosids.

Gaultherin wurde zuerst im Jahre 1844 von *Procter* in der Rinde von Betula lenta entdeckt; er konnte es nicht in reinem Zustand darstellen, er fand jedoch, dafs es bei der Zersetzung Methylsalicylat liefert; gleichzeitig stellte er fest, dafs dieselbe Rinde ein Enzym enthält, dafs Gaultherin spalten kann. Fünfzig Jahre später stellten *Schneegans* und *Gerock* das Glukosid aus demselben Material dar, aber nach einer Methode, die es ihnen ermöglichte, es in krystallinischer Form zu erhalten und seine Formel zu bestimmen.

Im selben Jahre fand *Bourquelot*, dafs das Wintergrünöl aus mehreren Arten von Polygala (P. vulgaris, P. calcarea und P. depressa), aufserdem aus Monotropa hypopythis, einem Parasit, der auf den Wurzeln mehrer Bäume wächst, hauptsächlich auf einigen Arten von Pinus, gewonnen werden kann. Mono-

Digitized by Google

tropa ist der typische Repräsentant der Ordnung der Monotropaceen, die manchmal als eine Unterordnung der Ericaceen betrachtet werden.

Beim Zerkleinern der Wurzeln der Polygalaarten oder der Stempel von Monotropa bemerkt man sehr bald den Geruch nach Wintergrünöl. *Bourquelot* stellte fest, dafs er durch die Zersetzung des Glukosids durch ein Enzym entsteht.

Bourquelot stellte sowohl das Glukosid, als auch das Enzym aus den Stempeln der Monotropa dar; sie finden sich jedoch nicht beide in denselben Zellen, und das bald nach dem Zerkleinern der Gewebe auftretende Methylsalicylat ist in der unverletzten Pflanze nicht vorhanden, sondern bildet sich erst bei der Zerkleinerung.

Er stellte das Enzym auf folgende Weise dar: frisch gesammelte Monotropa wurde in einem Mörser mit gewaschenem Sand zerrieben. Die Mischung wurde $^1/_2$ Stunde mit 95prozentigem Alkohol digeriert und dann abfiltriert. Der Filterrückstand wurde mit Alkohol, dann mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet. Das so bereitete Pulver enthielt das Enzym.

Selbstverständlich ist das so erhaltene Enzym nicht rein. Das Pulver enthält alle Substanzen der Pflanze, die in Alkohol und Äther unlöslich sind. Da jedoch das Glukosid in ersterem löslich ist, so kann man sich der Methode bedienen, um die beiden Körper, die an der Hydrolyse teilnehmen, zu trennen.

Bourquelot fand, dafs ein Zusatz einer kleinen Menge dieses Pulvers zu einer wässerigen Lösung von Gaultherin sehr schnell das Auftreten des Geruches nach Methylsalicylat bewirkt.

Dieselbe Wirkung kann leicht durch die Einwirkung von kochenden verdünnten Mineralsäuren hervorgebracht werden.

Gaultherase findet sich in beträchtlicher Menge in den Blättern und Beeren von Gaultheria procumbens. Das charakteristische Produkt ihrer Wirkung, das Methylsalicylat, kann auch leicht aus denselben Teilen der Pflanze durch Destillation mit Wasser gewonnen werden.

Bourquelot hat auch das Enzym aus den Wurzeln von Polygala calcarea und P. vulgaris, den Wurzeln von Spiraea Ulmaria, S. Filipendula und S. salicifolia, ferner aus den

Digitized by Google

Blättern und Blütenblättern verschiedener Arten von Azalea dargestellt.

Bourquelot hat die früheren Arbeiten von *Procter* und die Untersuchungen von *Schneegans* bestätigt, indem er nachwies, dafs dasselbe Enzym auch in der Rinde von Betula lenta vorkommt. Es erscheint nicht ganz gewifs, ob die Glukoside von Monotropa, Polygale und den anderen Pflanzen mit dem Gaultherin aus Betula lenta von *Schneegans* und *Gerock* identisch sind, es ist jedoch wahrscheinlich, da in allen Fällen das nämliche Enzym seine Zersetzung bewirkt und Wintergrünöl als ein Produkt der Hydrolyse auftritt.

Aufser diesen Enzymen kommen noch verschiedene andere in den Pflanzen vor, sie sind jedoch noch nicht so genau erforscht. Eines derselben beschrieb *Schützenberger*; es hydrolysiert Phillyrin, ein in der Rinde von Phillyrea latifolia vorkommendes Glukosid, und Populin, ein in der Rinde der Aspe vorkommendes Glukosid. Diese Glukoside werden von Hefe nicht angegriffen, auch nicht von Emulsin, scheinen jedoch durch das Buttersäure-Bakterium hydrolysiert zu werden.

Wie es scheint, ist das Enzym nicht isoliert worden.

Bréaudat hat ein anderes Glukosid spaltendes Enzym in den Blättern von Isatis alpina entdeckt, das Indican zersetzt, wobei Indigoweifs und ein unter dem Namen Indiglucin bekannter Zucker entsteht. Es ähnelt dem Emulsin insofern, als es Amygdalin spaltet, der Verfasser giebt jedoch nicht an, ob beide identisch sind.

Nach *Strecker* ist Tannin ein Glukosid, das der Hydrolyse zugänglich ist, wobei Gallussäure und Dextrose nach folgender Gleichung gebildet werden:

$$\underset{\text{Tannin}}{C_{27}H_{22}O_{17}} + 4H_2O = \underset{\text{Gallussäure}}{3C_7H_6O_5} + \underset{\text{Dextrose.}}{C_6H_{12}O_6}$$

Läfst man Aufgüsse gewisser Gallen stehen, so gären sie; Tannin verschwindet, dagegen treten Gallussäure, Ellaginsäure und Dextrose auf; das Enzym, das diese Hydrolyse bewirkt, ist noch nicht isoliert worden.

Neuerdings hat *Sigmund* behauptet, dafs die Enzyme dieser Gruppe auch die Fette im Glycerin und freie Fettsäuren zu spalten

Digitized by Google

vermögen. Er liefs Myrosin und Emulsin auf Olivenöl in verschlossenen Glasgefäfsen bei 38—40° C. einwirken; er giebt an, dafs sich in dem Gemisch allmählich und andauernd freie Fettsäuren bildeten, deren Gegenwart er mit Lackmus und Phenolphtaleïn nachwies.

Die Methode, nach der er die Enzyme dargestellt hat, ist jedoch nicht einwandfrei. Er zerkleinerte in einem Fall Senfkörner, im anderen Mandelkerne und teigte sie 12—14 Stunden in Wasser ein. Er gofs dann das Wasser ab und fügte einen Überschufs von Alkohol zu; es bildete sich ein Niederschlag, den er durch Filtration trennte, auswusch und bei 40° C. trocknete. Auf diese Weise wird wahrscheinlich weder Myrosin noch Emulsin isoliert; wenn ein anderes Enzym, z. B. auch ein fettspaltendes, neben den erstgenannten Enzymen in den Samen vorhanden wäre, so wäre es sicher auch in dem getrockneten Niederschlag. Obwohl bislang noch Niemand aus diesen Samen ein fettspaltendes Enzym isoliert hat, so hat man doch allen Grund, es sowohl in den Senfkörnern als in den Mandeln zu vermuten, da beide Öl enthalten. *Sigmund* führt ferner an, dafs gewisse fettspaltende Enzyme, die er in verschiedenen Samen fand, sowohl Amygdalin als Salicin zu spalten vermöchten. Hieran kann derselbe kritische Mafsstab angelegt werden. Die Methode, nach der er das Enzym gewann, war die oben beschriebene, und es ist zum mindesten möglich, dafs seine Niederschläge zwei Enzyme enthielten an Stelle des einen, wie er vermutete.

Welche Bedeutung diese verschiedenen Glukoside in der Ernährung der Pflanzen haben, ist noch ungewifs. Zweifellos kann der Zucker, den sie bei der Hydrolyse liefern, im Stoffwechsel nutzbar gemacht werden, ob jedoch die anderen Zerfallprodukte zu Nährzwecken dienstbar gemacht werden können, ist noch unbestimmt. Einige neuerdings von *Treub* veröffentlichte Untersuchungen scheinen wenigstens für eine Pflanze, nämlich Pangium edule darzuthun, dafs einige Blausäureverbindungen verwertbar sind. Jedoch sind in dieser Beziehung weitere Untersuchungen nötig.

Digitized by Google

Kapitel XI.

Proteolytische Enzyme. Die Proteolyse.

Die nächste in Betracht kommende Gruppe von Enzymen enthält diejenigen, die Eiweifsstoffe zu spalten vermögen. Sie kommen sowohl im tierischen, als auch im pflanzlichen Organismus vor und spielen beim Stoffwechselprozefs eine sehr wichtige Rolle. Wie die diastatischen Enzyme können sie ihre Wirkung sowohl innerhalb der Zelle entfalten, wie in den meisten pflanzlichen Organismen, oder aber sie können auch durch besondere Ausscheidungen in Lösungen übergeführt werden, wie im Darmkanal der Tiere.

Der Prüfung ihrer Wirkungsweise stellen sich gröfsere Schwierigkeiten in den Weg als sie das Studium der Diastasen bot. Die Zusammensetzung der Stärke ist annähernd bestimmt und die Folge von Zersetzungen, denen sie bei der Zymolyse unterliegt, kann durch chemische Gleichungen dargestellt werden, die, wenn sie auch nicht als absolut zutreffend, so doch als wahrscheinlich gelten können. Bei den Eiweifsstoffen stofsen wir jedoch auf ähnliche Schwierigkeiten wie bei der Cellulose. Wir wissen nichts über ihre Zusammensetzung und können sie nicht durch Formeln darstellen. Ebenso wie bei der Cellulose haben wir es auch nicht mit einer einzelnen Substanz zu thun, sondern mit einer grofsen Gruppe, deren Glieder untereinander beträchtliche Unterschiede in ihrem Verhalten aufweisen und zweifellos in verschiedener verwandtschaftlicher Beziehung zu einander stehen.

Wir finden, dafs gewisse Eiweifsstoffe, z. B. die Albumine und die Globuline, durch verschiedene Reagentien in verschiedener Weise gespalten werden können und dafs bei dieser Spaltung andere Eiweifsstoffe gebildet werden, denen wir mit Recht eine einfachere Zusammensetzung zuschreiben als dem Albumin und

Digitized by Google

dem Globulin. Wir finden ferner, dafs bei sehr weitgehenden Zersetzungen diese Körper krystallisierende Verbindungen liefern, die keine Eiweifsstoffe mehr sind, die der Chemiker vielmehr zu den Amiden zählt. Alle diese Körper kommen sowohl im tierischen als auch im pflanzlichen Organismus vor. Es ist demnach möglich, dafs die primären Albumine allmählich zersetzt werden, wobei eine gewisse Anzahl sekundärer Eiweifsstoffe entsteht, die schliefslich in krystallinische chemische Verbindungen übergeführt werden können, deren Konstitution und chemische Beziehungen wir ganz genau kennen.

Eine derartige Darstellung des Eiweifszerfalls erscheint jedoch noch sehr unvollkommen im Vergleich zur Stärkehydrolyse, bei der wir Gruppe für Gruppe sich abspalten sehen und das Schicksal jeder abgespaltenen Atomgruppe ziemlich zufriedenstellend verfolgen können.

Man hat das Eiweifsmolekül durch verdünnte Mineralsäuren bei niedrigen und hohen Temperaturen gespalten und dabei in jedem Falle verschiedene Produkte erhalten.

Wenn man ein Albumin mit 25prozentiger Salzsäure bei 40° C. längere Zeit digeriert, so enthält die Flüssigkeit nach einiger Zeit mindestens 4 Zersetzungsprodukte, die man unter dem Namen Antialbumat, Antialbumid, Hemialbumose und Hemipepton kennt. Antialbumat kann von den übrigen durch sorgfältige Neutralisation der Flüssigkeit mit einem schwachen Alkali getrennt werden. *Gillespie* giebt an, dafs es eben vor vollendeter Neutralisation ausfällt. Es ist nur in schwach sauren oder schwach alkalischen Lösungen löslich und unterscheidet sich von Albumin und Globulin dadurch, dafs es beim Kochen seiner Lösungen nicht koaguliert wird. Antialbumid scheint durch weitere Einwirkung der Säure auf Antialbumat zu entstehen; es ist fast oder ganz unlöslich in sauren Flüssigkeiten, so dafs es bei fortschreitender Wirkung der Säure als körnig aussehender Niederschlag ausfällt. Es ist in etwas stärker alkalischen Flüssigkeiten löslich, z. B. in 1 prozentiger Natronlauge. Die Hemialbumose scheint nicht von diesen beiden abzustammen. Sie ist in sauren und neutralen Lösungen löslich, so dafs sie bei der Neutralisation nicht ausgefällt wird. Sie fällt aber aus auf Zusatz kleiner Mengen Salpetersäure oder von Essigsäure bei Gegenwart von

Digitized by Google

gelbem Blutlaugensalz; der Niederschlag löst sich beim Erwärmen auf, scheidet sich aber beim Abkühlen wieder aus. Das Pepton, auch manchmal **Hemipepton** genannt, scheint bei weiterer Zersetzung der Hemialbumose gebildet zu werden. Es ist löslich in Säuren, Alkalien und in neutralen Flüssigkeiten, wird auf Zusatz von Salpetersäure sowie Essigsäure und Blutlaugensalz nicht gefällt, auch koaguliert seine Lösung beim Kochen nicht. Weitere Reaktionen dieser Körper werden noch später angegeben.

Die Zersetzung des Albumins durch verdünnte Salzsäure bei 40° C. stellt *Kühne*, dessen Forschungen wir viel auf diesem Gebiet verdanken, durch folgendes Schema dar:

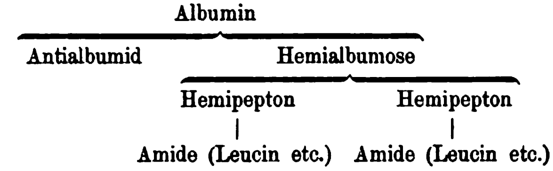
Albumin

Antialbumat — Hemialbumose

Antialbumat → Antialbumid

Hemialbumose → Hemipepton — Hemipepton

Eine tiefergehende Zersetzung bewirkt 3—5prozent. Schwefelsäure beim Kochen. Es scheint, daſs das Albumin sich wie oben in zwei Gruppen spaltet, es bildet sich aber entweder kein Antialbumat, oder aber es wird sofort in Antialbumid übergeführt. Auf der Seite der Hemigruppe bilden sich sowohl Hemialbumose als auch Hemipepton, letzteres wird noch weiter zersetzt, wobei sich Amidkörper bilden, von denen **Leucin** und **Tyrosin** die bekanntesten sind. *Kühne* stellt die Zersetzung folgendermaſsen dar:



Der Gedanke *Kühnes*, daſs das Eiweiſsmolekül ein doppeltes sei und in eine Anti- und eine Hemihälfte gespalten werden könne, von denen jede für sich in verschiedener Weise weiter zersetzt wird, wird durch die Beobachtungen *Schützenbergers* über die Einwirkung kochender Mineralsäuren auf die Eiweiſskörper unterstützt. Er kommt zu dem Schluſs, daſs nur die Hälfte des Eiweiſsmoleküls durch die Säure leicht zersetzt wird, die andere aber in etwas modifiziertem Zustande, jedoch noch ziemlich unverändert verbleibe. Diese Hälfte nannte *Schützenberger* **Hemiproteïn**; sie ist mit *Kühnes* Antialbumid identisch.

Digitized by Google

Über die enzymatische Zersetzung der Eiweifsstoffe ist schon viel gestritten worden. Von den eiweifsspaltenden Enzymen kennt man hauptsächlich zwei Gruppen, deren Typen das Pepsin der Magenausscheidung der Säugetiere und das Trypsin des Pankreas sind. Jede besitzt ausgesprochene Eigentümlichkeiten; während sie einander im allgemeinen in ihrer Wirkungsweise gleichen, so unterscheiden sie sich doch in dem Grad ihrer Einwirkung auf die primären Eiweifsstoffe.

Übergehen wir einstweilen die früheren Untersuchungen über diese Enzyme, so stofsen wir zuerst auf die Untersuchungen von *Meifsner* und seiner Schüler, die in den Jahren 1859—62 ausgeführt wurden. *Meifsner* erkannte zwar die Fähigkeit eines Pankreasauszugs, die Eiweifsstoffe zu spalten, er arbeitete jedoch hauptsächlich mit Pepsin in Gegenwart kleiner Mengen Salzsäure. Er digerierte mehrere primäre Eiweifsstoffe mit diesen Reagentien verschiedene Zeit bei 38° C., der Körpertemperatur, und prüfte die verschiedenen Zersetzungsprodukte. Beim Neutralisieren der Flüssigkeit fiel gerade eben vor Erreichung des Neutralisationspunktes ein Niederschlag aus, der dieselben Eigenschaften aufwies wie das *Kühne*sche Antialbumat. *Meifsner* nannte diesen Körper Parapepton. Nach dem Abfiltrieren bewirkte der Zusatz einer Spur Säure zum Filtrat manchmal noch in geringer Menge einen neuen Niederschlag, dem er den Namen Metapepton beilegte. Wenn er auf diese Weise das Kaseïn prüfte, so bildete sich eine kleine Menge eines anderen Eiweifsstoffes, den er Dyspepton nannte. Die Digestionsflüssigkeit enthielt nach Entfernung dieser Körper drei andere Eiweifsstoffe, die er für verschiedene Arten von Peptonen hielt und die er a-, b- und c-Pepton nannte.

Er beschreibt die Reaktionen dieser Körper wie folgt:

1. Parapepton. Löslich in verdünnten Säuren oder Alkalien; koaguliert beim Kochen nicht; fällt beim Neutralisieren aus; kann durch Pepsin nicht in Pepton übergeführt werden, jedoch durch Digerieren mit Pankreas.
2. Metapepton. Unlöslich in sehr verdünnten Säuren (0,05 bis 0,1 %), löslich in 0,2 prozentigen Säuren.
3. Dyspepton. Unlöslich in verdünnten Säuren, löslich in verdünnten Alkalien.

Digitized by Google

4. a-Pepton. Löslich in sauren, alkalischen oder neutralen Flüssigkeiten, koaguliert beim Kochen nicht; wird durch starke Salpetersäure gefällt, ebenso durch Essigsäure bei Gegenwart von gelbem Blutlaugensalz.
5. b-Pepton. Dem a-Pepton sehr ähnlich, wird jedoch von starker Salpetersäure nicht gefällt. Wird von gelbem Blutlaugensalz bei Gegenwart von viel starker Essigsäure gefällt.
6. c-Pepton. 4 und 5 ähnlich, doch weder fällbar mit starker Salpetersäure noch mit Essigsäure und Blutlaugensalz.

Meifsners zeitgenössische Gegner konnten seine Ergebnisse nicht bestätigen, bis auf das Parapepton und das c-Pepton. *Meifsner* schrieb die Bildung aller von ihm beschriebenen Körper der spezifischen Wirkung des Pepsins auf die primären Eiweifsstoffe zu. Die hauptsächlich unter dem Einflufs *Brückes* allgemein angenommene Ansicht war die, dafs die beiden erwähnten Körper die einzigen Produkte der peptischen Digestion seien; dafs der erstere, das Parapepton, ein Produkt der benutzten Säure sei, und dafs das Pepsin es in Pepton in einem späteren Stadium der Digestion zu verwandeln vermöge.

Spätere Arbeiten jedoch haben gezeigt, dafs *Meifsners* Anschauung der Wahrheit näher kam, als ihm dies seine Gegner zugestehen wollten.

Der Gegenstand wurde einige Jahre später wieder von *Kühne* aufgegriffen, der sehr sorgfältig und eingehend die Zersetzung der primären Eiweifsstoffe studierte, sowohl die Zersetzung mit Pepsin als auch die mit Trypsin, wobei die erstere eine sauere Digestion darstellt, letztere im Tierkörper wahrscheinlich unter alkalischer Reaktion verläuft. *Kühne* fand, dafs in beiden Fällen in den ersten Stadien ein Eiweifskörper gebildet wird, der beim Neutralisieren der Digestionsflüssigkeit ausfällt, gerade ehe die Neutralisation genau erreicht ist. Er fand weiter, dafs die Endprodukte andere sind bei Verwendung von Trypsin an Stelle von Pepsin, dafs nämlich nur in ersterem Falle die Amide Leucin und Tyrosin auftreten. Wurde auch die Digestion noch so lange Zeit durchgeführt, so war die Überführung des Eiweifsstoffes in Amidkörper doch nie eine vollständige; die Endprodukte waren ein Gemenge von Amiden mit Pepton und Hemialbumose, die nämlichen Substanzen, die er unter der Einwirkung von Säuren erhielt.

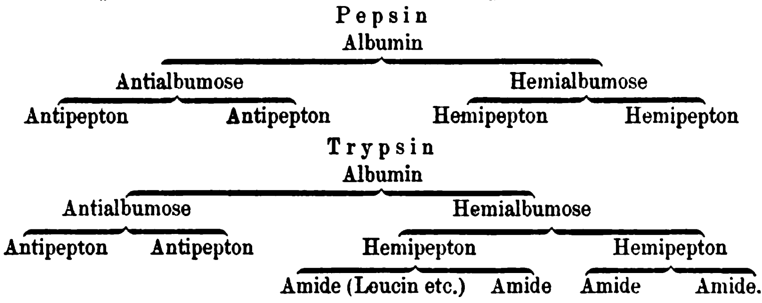
Digitized by Google

Die Endprodukte der peptischen Verdauung waren dieselben, nur waren keine Amide gebildet.

Kühne kam zu der Anschauung, dafs die Zersetzung der Eiweifsstoffe hauptsächlich eine Hydrolyse ist, ähnlich der Spaltung des Rohrzuckers durch Invertase; und da bei dieser Zersetzung zwei verschiedene, aber ähnliche Zucker gebildet werden, so glaubte er, dafs die Hydrolyse der Eiweifsstoffe zur Bildung zweier Peptonarten führe, die sich voneinander in gewissen Punkten unterscheiden. Diese Anschauung wurde unterstützt durch die konstante Anwesenheit von etwas Pepton neben den Amiden bei einer durch lange Zeit hindurch fortgesetzten tryptischen Digestion. *Kühne* glaubte, dafs die Amide aus der Zersetzung einer Hälfte des gebildeten Peptons herstammten, und dafs die andere Hälfte einer derartigen Spaltung nicht fähig sei und deswegen auch noch nach noch so lange fortgesetzten Digestionen vorhanden sei.

Auch bei der Behandlung des während einer peptischen Digestion erhaltenen Peptones mit Trypsin konnte das Pepton nicht ganz in Amid übergeführt werden; *Kühne* wurde hierdurch in seiner Anschauung noch bestärkt.

Er fand, dafs die in beiden Digestionen vorhandene Hemialbumose durch Pepsin wenigstens teilweise in ein Pepton umgewandelt wurde, das weiterhin durch Trypsin in Leucin und Tyrosin übergeführt werden konnte, während die Neutralisationsprodukte früherer Stadien der Digestion ein Pepton lieferten, das einer weiteren derartigen Zersetzung nicht fähig war. So gelangte er zu folgender schematischen Darstellung des Eiweifsalbums:



Bei der peptischen sowohl, als auch bei der tryptischen Verdauung wird hiernach das primäre Eiweifs in zwei Reste gespalten, von denen jeder wieder weiter gespalten wird. Die erste

Digitized by Google

Gruppe, die Antigruppe, wird nicht so tiefgehend gespalten als die zweite und liefert unter natürlichen Verhältnissen kein weiter abgebautes Produkt als Pepton. Die andere, die Hemi-Gruppe, verhält sich gegen Pepsin und Trypsin verschieden, ersteres verwandelt sie nur in Pepton, letzteres verwandelt dieses in Leucin, Tyrosin und andere Amide.

Die Reaktionen dieser Spaltungsprodukte der Eiweifsstoffe sind kurz folgende:

Antialbumose. Löslich in schwachsauren oder alkalischen Medien, unlöslich in neutralen. Wird beim Kochen nicht gefällt, wird sowohl von Pepsin als auch von Trypsin in Pepton übergeführt; das Pepton ist Antipepton.

Hemialbumose. Löslich in neutralen, sauren und alkalischen Medien. Koaguliert beim Kochen nicht. Wird durch kleine Mengen Salpetersäure gefällt, ebenso durch gelbes Blutlaugensalz bei Gegenwart von einer Spur Essigsäure, oder auch durch einige Tropfen einer gesättigten Lösung von Chlornatrium bei Gegenwart von starker Essigsäure; der Niederschlag verschwindet beim Erwärmen und tritt beim Abkühlen wieder auf.

Antipepton. Löslich in neutralen, alkalischen oder sauren Medien; koaguliert beim Kochen nicht; wird weder von Mineralsäuren, noch durch Essigsäure und Blutlaugensalz gefällt. Kann durch Trypsin nicht in Amide übergeführt werden.

Hemipepton. Unterscheidet sich von Antipepton nur dadurch, dafs es durch Trypsin in Leucin, Tyrosin etc. übergeführt werden kann.

Beide Peptone können von den Albumosen durch Sättigen der kochenden Lösung mit Ammoniumsulfat getrennt werden; letzteres fällt die Albumosen.

Ein Gemisch dieser zwei Peptone, wie es in der peptischen Digestion vorliegt, wird als Amphopepton angesprochen.

Dieses Schema der Hydrolyse, obwohl es in der Hauptsache bis auf den heutigen Tag noch anerkannt wird, ist nicht ganz vollständig. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dafs es in einigen wichtigen Einzelheiten abgeändert werden mufs, da die Albumosen keine so wohl definierten Körper sind, wie *Kühne* dies

Digitized by Google

angenommen hat. Unterwirft man die Antialbumose der Einwirkung von Pepsin oder Trypsin, so tritt während der Digestion stets ein besonderer, unlöslicher Körper auf, der dieselben Reaktionen aufweist, wie das Antialbumid, das bei der Einwirkung von Säuren auf Eiweiſs erhalten wird. Der gröſste Teil desselben kann mit einiger Schwierigkeit durch Trypsin, aber nicht durch Pepsin in Antipepton übergeführt werden. Auch die Hemialbumose hat man als ein Gemisch verschiedener Körper erkannt, die eher nacheinander als gleichzeitig gebildet werden. Die Untersuchungen von *Kühne* sind jedoch ein entschiedener Fortschritt in unserer Kenntnis der Proteolyse, obwohl die Vorgänge sich mehr stufenweise abspielen, als dies seine Theorie erkennen läſst.

Es ist interessant, die von *Kühne* erkannten Körper mit den 15 Jahre früher von *Meiſsner* beschriebenen zu vergleichen. Nach ihren Reaktionen gleicht *Meiſsners* Parapepton in jeder Beziehung der Antialbumose, mit der Ausnahme, daſs *Meiſsner* seinem Körper das Vermögen, durch Pepsin peptonisiert zu werden, abspricht. Dyspepton ist wahrscheinlich identisch mit Antialbumid, obgleich *Meiſsners* Körper wahrscheinlich mit Nukleïnen gemischt war. Die Hemialbumose stimmt sehr genau mit *Meiſsners* a-Pepton überein, obwohl die Reaktion des letzteren nicht genau beschrieben ist. Das c-Pepton von *Meiſsner* war das, was man jetzt Amphopepton nennt, ein Gemisch der zwei Peptone des *Kühne*schen Schemas.

Weitere Untersuchungen von *Kühne* und *Chittenden* über die Hemialbumose haben gezeigt, daſs diese kein bestimmter Körper ist, sondern ein Gemisch von vier nahe verwandten, aber verschiedenen Albumosen. Der Name Albumose wird ersetzt durch Proteose für die Glieder dieser Gruppe; dieser letztere Ausdruck deutet an, daſs sie die Zersetzungsprodukte primärer Eiweiſsstoffe im allgemeinen sind und nicht des Albumins im besonderen. Der Gehalt einer Hemialbumose an diesen verschiedenen Bestandteilen richtet sich nach den Bedingungen, unter denen diese dargestellt wurde. Es giebt folgende charakteristische Proteosen:

1. Proto-Proteose. Löslich in heiſsem oder kaltem Wasser und verdünnten neutralen Salzlösungen; wird gefällt durch Sättigen der Lösung mit Kochsalz oder Magnesiumsulfat.

Digitized by Google

2. Hetero-Proteose. Unlöslich in Wasser, wird daher bei der Dialyse der Salzlösungen ausgefällt. Löslich in Kochsalzlösungen und wird daraus durch Kochsalzzusatz bis zur Sättigung ausgefällt.
3. Deutero-Proteose. Löslich in Wasser, wird durch Sättigen mit Kochsalz nur dann ausgefällt, wenn gleichzeitig eine Säure zugegeben wird. Wird durch Sättigung seiner Lösung mit Ammoniumsulfat gefällt. Dieser Körper steht den Peptonen sehr nahe.
4. Dys-Proteose. Diese ähnelt sehr der Hetero-Proteose, von der sie sich nur dadurch unterscheidet, dafs sie in Salzlösungen unlöslich ist. Sie wird wahrscheinlich aus der Hetero-Proteose durch eine Art Koagulation gebildet.

Alle Proteosen können von den Peptonen getrennt werden durch Sättigung ihrer Lösung mit Ammoniumsulfat oder, nach *Bömer*, mit Zinksulfat. Die Sättigung mufs sehr vollständig sein, und die Flüssigkeit mufs nacheinander neutral sauer und alkalisch gemacht werden. Bei erreichter Sättigung fallen die Proteosen aus.

Das *Kühne*sche Schema der Hydrolyse ist von *Neumeister* abgeändert worden. Nach ihm stammen die Proteosen nicht alle von dem Hemi-Rest der ersten Hydrolyse, sondern einige von ihnen stammen von der Anti-Gruppe. Nach dieser Theorie besteht das Albumin aus Hemi-Albumin und Anti-Albumin. Das erste Stadium der Zersetzung besteht darin, dafs das Hemi-Albumin gespalten wird in Proto-Proteose und Hetero-Proteose, während aus dem Anti-Albumin Acid-Albumin und Hetero-Proteose entsteht. Der nächste Schritt ist die Umwandlung der Proto-Proteose und beider Hetero-Proteosen in Deutero-Proteosen, das Endstadium ist die Bildung von Anti- und Hemi-Peptonen aus den Gliedern der verschiedenen Gruppen.

Neumeister behauptet, dafs bei der Hydrolyse durch Trypsin keine Proto- und Hetero-Proteose gebildet wird, dafs jedoch im ersten Stadium der Einwirkung mehrere Deutero-Proteosen auftreten.

Während des letzten Jahrzehnts wurden von *Chittenden* und seinen Schülern sehr sorgfältige und eingehende Untersuchungen über die Umwandlungen der Eiweifsstoffe unter der Einwirkung von Pepsin und Salzsäure ausgeführt, welche darauf hindeuten,

Digitized by Google

dafs der hydrolytische Eiweifsabbau-Prozefs mehr stufenweise verläuft. Einige Versuche über den Abbau des krystallisierten Globulins oder Vitellins aus Hanfsamen zeigten, dafs bei verschiedenen Digestionen verschiedene Arten von Proto-Vitellose erhalten werden, die sich in ihren chemischen Reaktionen ganz gleich verhalten, jedoch verschieden sind in ihrer prozentischen Zusammensetzung und vielleicht in ihrem spezifischen Drehungsvermögen. Die unter verschiedenen Versuchsbedingungen erhaltene Deutero-Vitellose zeigte auch Unterschiede in ihrer prozentischen Zusammensetzung. In den ersten Stadien aller Digestionen beobachtete *Chittenden* die Bildung eines Körpers, der *Kühnes* Antialbumose glich und der die Reaktionen eines Acid-Albumins aufwies; dies verschwand allmählich und hinterliefs einen unverdaulichen Rest von Anti-Albumid. Wurde dieses abfiltriert, so enthielt die Flüssigkeit nur Proteosen und Peptone. Er betont ausdrücklich, dafs er die Bildung von Pepton direkt aus Acid-Albumin nicht beobachten konnte, sondern nur aus den Proteosen.

Die Pepsin-Proteolyse führt also durch Hydratation und Spaltung zur Bildung einer Reihe von Produkten, von denen viele wohlcharakterisiert sind, nämlich Proto-Proteose, Hetero-Proteose, Deutero-Proteose und Amphopepton. Die Proteosen können jede eine Gruppe von naheverwandten Körpern umschliefsen, so nahe verwandt, dafs man sie durch chemische Reaktionen nicht von einander unterscheiden kann, und die genauere Zusammensetzung jeder Gruppe kann von der Länge und Intensität des proteolytischen Prozesses abhängen.

Diese Proteosen stellen bestimmte Stadien in dem Fortschritt der Hydrolyse dar; die Proto- und Hetero-Körper liefern Deutero-Proteose, und letztere wird in Pepton umgewandelt. Diese Umwandlung ist jedoch nicht vollständig; die Menge der nebeneineinander am Schlusse einer Digestion gebildeten Proteosen und Peptone wechselt beträchtlich. Bei einer 10tägigen Digestion des Vitellins fand man 23 % Proteosen und 27 % Pepton. Bei einem andern Versuch mit Eieralbumin waren nach 17tägiger Einwirkung 44 % Proteose und 56 % Pepton gebildet. Die Schwierigkeit, alles umzuwandeln, ist nicht in einem hemmenden Einflufs begründet, den die gebildeten Umwandlungsprodukte auf die Wirkung des Enzyms ausüben, wie dies der Fall ist bei der Über-

Digitized by Google

führung der Stärke in Maltose, denn man erhielt dieselben Resultate, wenn der Eiweifsabbau in Dialysierröhren vorgenommen wurde, welche eine Entfernung der Produkte nach ihrer Bildung gestatteten.

Ein Vergleich der Proteolyse mit der Stärkehydrolyse zeigt in anderer Beziehung eine Ähnlichkeit. Das Endprodukt ist nämlich imstande, vermittelst Dialyse durch eine feuchte Membran, zum Beispiel Pergamentpapier, hindurch zu gehen; Zucker dialysiert vollständig, Stärke ganz und gar nicht. Die primären Eiweifsstoffe, wie zum Beispiel Albumin und Globulin, sind auch der Dialyse nicht fähig, Pepton auf der anderen Seite geht mit grofser Leichtigkeit hindurch. Die Proteosen, die zwischen beiden stehen, bekunden auch bezüglich der Dialyse eine Zwischenstellung. Hetero-Proteose steht in dieser Beziehung sehr zurück, dann kommen die Deutero-Proteose und dann die Proto-Proteose; die beiden letzten zeigen wenig Unterschied, alle aber stehen dem Pepton in der Dialysierbarkeit weit nach. *Kühne* giebt als relatives Dialysiervermögen für Hetero-Proteose 5,22, für Deutero-Proteose 24,1, für Protro-Proteose 28,3 und für Pepton 51 an.

Nach *Gillespie* verhält sich das Dialysiervermögen von Proto-Albumose, Deutero-Albumose und Pepton aus Eieralbumin wie 2,5 : 5,4 : 23,8.

Die Wahrscheinlichkeit, dafs der Prozefs der Eiweifszersetzung sowohl durch Säuren, als auch durch Enzyme eine Hydrolyse ist, wird nicht nur unterstützt durch die Analogie mit der Wirkung anderer Enzyme und durch den allgemeinen Verlauf des Prozesses, soweit man ihn ohne wirkliche Kenntnis der molekularen Zusammensetzung des Eiweifses verfolgen kann, sondern auch durch den Vergleich mit der prozentischen Zusammensetzung der verschiedenen Eiweifsabbauprodukte im Zustand der Reinheit, wie er durch unsere gegenwärtigen Methoden ermöglicht ist. Der Kohlenstoffgehalt nimmt auf dem Wege vom Albumin zum Pepton allmählich ab. Gleichzeitig nimmt aber der Wasserstoffgehalt in demselben Mafse zu, wie es eine Einlagerung von Wasser in das Molekül bedingt. Man darf hierauf jedoch kein zu grofses Gewicht legen, denn unsere Beweise für die Reinheit irgend eines Eiweifsstoffes sind ungenau, und bei so grofsen Molekülen, wie sie die Eiweifskörper haben müssen, ist bei einer derartigen Berechnung Spielraum für beträchtliche Irrtümer.

Digitized by Google

Die Spaltung der Eiweifsstoffe ist neuerdings noch weiter verfolgt worden, indem man sie mit Wasser unter Druck bei Temperaturen weit über 100° erhitzte. Unter solchen Bedingungen hat *Neumeister* die Spaltung des Fibrins mit Wasser von 160° C. durchgeführt; dabei bilden sich andere Eiweifsstoffe, die er Atmid-Albumin und Atmid-Albumose nennt; gleichzeitig bildet sich Pepton und eine gewisse Menge Schwefelwasserstoff, auch Schwefelammonium ist in der Flüssigkeit nachweisbar. Die beiden neuen Eiweifskörper ähneln sehr andern aus der Gruppe der durch Enzymwirkung erhaltenen Eiweifsstoffe, und beide können durch Behandlung mit Schwefelsäure in Deutero-Albumose umgewandelt werden. *Chittenden* und *Meara* fanden in ähnlicher Weise, dafs Eieralbumin beim mehrstündigen Erhitzen mit Wasser in geschlossenen Gefäfsen auf 150—160° zersetzt werden kann. Die Umwandlungsprodukte waren hauptsächlich Atmidkörper, die den von *Neumeister* aus Fibrin erhaltenen entsprachen, sie unterscheiden aber zwei Formen von Atmid-Albumose. Sie beobachteten auch die Bildung von Pepton, Leucin, Tyrosin, während beim Öffnen der Röhren die Entbindung von Schwefelwasserstoff und anderer unangenehmer Gase beobachtet werden konnte.

Die Wirkung des Wassers bei so hohem Druck und so hohen Temperaturen ist im höchsten Grade hydrolytisch, die Ähnlichkeit der dabei erhaltenen Produkte mit den bei der Zymolyse erhaltenen stützt im hohen Mafse die Ansicht, dafs letztere ebenfalls ein hydrolytischer Prozefs ist.

Die Ansicht wird weiter unterstützt durch die Thatsache, dafs es möglich ist, Pepton durch die Einwirkung entwässernder Mittel in einen dem Acid-Albumin ähnlichen Körper überzuführen, welches, wie wir gesehen haben, als Zwischenprodukt während der Umwandlung des Albumins oder Globulins in Pepton gebildet wird. Wenn man 100 Teile trockenes Pepton mit dem zweifachen Gewicht an Essigsäureanhydrid mischt und das Gemisch eine Zeitlang auf 80° erhitzt, schliefslich den Überschufs von Essigsäureanhydrid abdestilliert und den Rückstand dialysiert, so findet man, dafs das Pepton in einen Eiweifsstoff umgewandelt ist, der nicht diffundiert, in verdünnten Alkalien löslich ist und durch Essigsäure und gelbes Blutlaugensalz, ebenso durch viele Metallsalze gefällt wird, ganz wie das bei gewöhnlichen Eiweifs-

Digitized by Google

stoffen der Fall ist. Nach *Hofmeister* kann man eine ähnliche Wirkung erzielen durch längeres Erhitzen von Pepton auf 140° C. Die sich ergebende braune Masse enthält einen in Wasser löslichen und einen unlöslichen Teil, welche sich in derselben Weise zu einander verhalten wie ein Globulin zu einem durch Abbau daraus gewonnenen Eiweifsstoffe.

Es wurden auch noch andere Ansichten geäufsert über die Verwandtschaft zwischen gewöhnlichen Eiweifsstoffen und Pepton; einige Forscher sind der Ansicht, dafs die Peptone Polymere, andere, dafs sie Isomere der primären Eiweifsstoffe sind. *Adamkiewicz* vermutet, dafs das Pepton ein Gemisch ist, welches durch Behandlung mit Phosphorwolframsäure in zwei Teile zerlegt werden kann, von denen einer etwas mehr Sauerstoff enthält als der andere, und dafs beide Körper Ureïde sind. Fibrin hält er andererseits für eine Art Ätherverbindung, welche durch das Enzym verseift wird und sich durch Wasseraufnahme in die beiden gefundenen Körper spaltet. Die Umwandlung beruht also auf einer Hydratation und ist das Ergebnis der Zersetzung eines Äthers durch Verseifung.

Digitized by Google

Kapitel XII.

Proteolytische Enzyme (Fortsetzung).

Wir haben in dem vorhergehenden Kapitel gesehen, dafs die Enzyme, welche die Zersetzung der primären Eiweifsstoffe, z. B. Albumin, Fibrin etc. bewirken können, in 2 Gruppen zerfallen, welche durch das Pepsin des Magensaftes und das Trypsin des Pankreas verkörpert werden. Sie ähneln sich in ihrer Fähigkeit, das Eiweifsmolekül zu spalten, indem sie wahrscheinlich eine Hydrolyse oder Zersetzung nach Einführung von einem oder mehreren Molekülen Wasser in die Wege leiten. Die ersten Spaltungsprodukte des primären Eiweifses sind wahrscheinlich in beiden Fällen dieselben, indem identische, oder wenigstens korrespondierende sekundäre Produkte gebildet werden. Die beiden Enzyme unterscheiden sich jedoch in dem Grade, bis zu welchem sie die Zersetzung durchführen; das peptische Enzym baut nur soweit ab, dafs das Endprodukt noch unzweifelhaft ein Eiweifsstoff ist, nämlich Pepton; das tryptische Enzym spaltet dieses weiter unter Bildung von Amiden, z. B. Leucin, Tyrosin, Asparagin und anderen. Dafs diese Amide Zersetzungsprodukte des Eiweifses sind, ist ferner dadurch bewiesen, dafs im Pflanzenstoffwechsel sie oder einige von ihnen die Vorläufer des Eiweifses sind, d. h. sie nehmen an dessen Aufbau teil, indem sie aus den Zellen verschwinden, sobald Eiweifs gebildet wird. Die tryptischen Enzyme sind demgemäfs die bei weitem energischsten. Sie sind sowohl im Tier- als auch im Pflanzenkörper am verbreitetsten, so dafs, wenn nur ein proteolytisches Enzym in einem Organismus vorhanden ist, es fast immer ein tryptisches ist. Beim Ernährungsprozefs scheint es nötig oder doch wenigstens nützlich zu sein, dafs das Eiweifsmolekül so weit als möglich in einfachere Körper gespalten wird, ähnlich wie die komplizierten Kohlenhydrate in Zucker zerfallen.

Digitized by Google

Pepsin.

Dieses Enzym wird am zweckmäfsigsten aus dem Magen des Hundes oder des Schweines dargestellt, indem die Schleimhaut von den darunter liegenden Muskelhäuten getrennt, dann fein zerkleinert und in 0,2prozentige Salzsäure eingeteigt wird. Während des Einteigens löst sich der gröfste Teil der Haut. Nach einiger Zeit filtriert man die Flüssigkeit von den unverdauten Resten ab; Flüssigkeit ist dann stark proteolytisch. Oder man extrahiert die Haut mit Glycerin, was den Vorteil hat, dafs es die Eiweifsstoffe nicht so weitgehend löst wie die verdünnte Salzsäure. Da der Glycerinauszug ohne Salzsäure bereitet wird, so wird die Haut nur schwach verdaut, so dafs der Glycerinauszug viel reiner ist als der Säureauszug. Keine der beiden Methoden jedoch liefert das Pepsin frei von Eiweifs. *Pekelharing* giebt an, dafs solch künstlicher Magensaft durch Dialyse gereinigt werden könne; dabei geht aber eine beträchtliche Menge des Enzyms verloren. Das Pepsin des Handels ist ein sehr rohes Produkt; es wird meistens nach einer zuerst von *Scheffer* angewandten Methode dargestellt, die darin besteht, dafs ein saurer Auszug aus der Schleimhaut des Schweinemagens mit einem neutralen Salze gesättigt wird. Wie wir gesehen haben, scheidet man auf diese Weise die Verdauungsproteosen aus der Flüssigkeit aus; das Pepsin haftet ihnen an und kann so zum grofsen Teil aus dem Auszug niedergeschlagen werden. Der klebrige Niederschlag wird abfiltriert und bei niedriger Temperatur getrocknet; er bildet ein blafsgelbes oder rötlichgelbes Pulver.

Man kann jedoch aus dem Magen das Enzym in einem verhältnismäfsig reinen Zustand darstellen, indem man von dessen Eigentümlichkeit Gebrauch macht, mit irgend einem indifferenten Niederschlag aus der Lösung, in der es enthalten ist, auszufallen. Diese Methode wurde zuerst von *Brücke* im Jahre 1861 angewendet. Er extrahierte die zerkleinerte Magenhaut mit einer beträchtlichen Menge Wasser, welches 5 % Phosphorsäure enthielt; durch Filtration trennte er die festen Teile und fügte zum Filtrat annähernd bis zur Neutralisation Kalkwasser. Es fiel ein schwerer Niederschlag von Calciumphosphat aus, der das Pepsin fast ganz mitrifs, gemischt jedoch mit einer gewissen Menge Eiweifssubstanz. Der Niederschlag wurde alsdann sorgfältig in verdünnter Salz-

Digitized by Google

säure gelöst, wobei ein Überschufs vermieden wurde, und wieder mit Kalkwasser ausgeschieden. Eine gewisse Menge des Eiweifses fiel nicht mehr mit aus, so dafs ein reineres Enzympräparat erhalten wurde. Dieses wurde wieder in Salzsäure gelöst; dann wurde eine Lösung von Cholesterin in neun Teilen Alkohol und einem Teil Äther mittelst Trichters auf den Boden des das Pepsin enthaltenden Gefäfses eingeführt. Cholesterin ist in Wasser unlöslich; wenn daher die leichte Lösung desselben an die Oberfläche geht, scheidet sich das Cholesterin in der Flüssigkeit als sehr feiner Niederschlag aus. Die Trennung wurde durch Schütteln der Flasche erleichtert. Das Pepsin haftet, wie vorher, dem indifferenten Niederschlag an, wird durch Filtration getrennt, mit verdünnter Salzsäure gewaschen und dann in wenig Wasser verteilt. Die Masse wurde dann mit Äther ausgeschüttelt, der das Cholesterin löste und das Pepsin im Wasser gelöst zurückliefs. Letzteres wurde vermittelst eines Scheidetrichters abgelassen. Die Ätherausschüttelung mufs, um alles Cholesterin zu entfernen, mehrmals wiederholt werden. Der Äther wurde vollständig vom wässerigen Auszug getrennt, indem man diesen an der Luft stehen liefs, filtrierte und dialysierte.

Maly modifizierte diesen Prozefs, der, anstatt das Pepsin mit Cholesterin zu trennen, die salzsaure Lösung dialysierte bis sie von Phosphaten und Chloriden frei war. Auf diese Weise entfernte er fast alle beigemischten Substanzen.

Die Methoden, die *Wittich*, *Würtz* und *Loew* zur Darstellung der Diastase angewendet haben, lassen sich auch zur Extraktion des Pepsins benutzen. *Loews* Bleimethode wurde früher zur Darstellung des Handelspepsins benutzt, wurde jedoch verlassen, weil sich herausstellte, dafs die letzten Spuren Blei sehr schwer zu entfernen sind und ein grofser Teil des Pepsins bei der Darstellung im grofsen verloren geht.

Pekelharing arbeitete in der Weise, dafs er den Magensaft in destilliertes Wasser dialysierte, bis Säure und Salze verschwunden waren. Das Pepsin schied sich auf diese Weise im Dialysator aus. Durch Wiederauflösen in verdünnter Salzsäure wurde ein reineres Produkt erhalten, wobei schwerer lösliches Eiweifs zurückblieb. Durch mehrmalige Wiederholung wurde das Produkt weiter gereinigt. Schliefslich erhielt *Pekelharing* ein für

Digitized by Google

die Analyse genügend reines Produkt. Er fand, dafs es Eiweifsreaktion gab und Phosphor enthielt, von diesem allerdings noch nicht 1 % der Gesamtmenge.

Der Hauptort, an dem sich das Pepsin bildet, ist der Magen der Wirbeltiere, in dessen Schleimhaut sich zahlreiche eng aneinanderliegende Drüsen befinden, die es im Überflufs ausscheiden. Die ganze Magenschleimhaut ist mit diesen Drüsen versehen, die verschiedenen Stellen liefern jedoch nicht gleich wirksamen Magensaft. Am meisten Pepsin liefern die Drüsen am Magenmund. Nach dem Pförtner zu, auf dem Wege über die gröfsere Krümmung, scheiden es die Drüsen in immer geringerer Menge aus, und die Drüsen am Pförtner selbst scheiden nur noch ganz wenig aus.

Pepsin kommt im Magensaft mit einem anderen Enzym vergesellschaftet vor, das Milch zum Gerinnen bringt.

Bei einigen der niederen Wirbeltiere ist die Bildung des Pepsins nicht auf die Drüsen des Magens beschränkt, sondern es wird durch ähnliche Gebilde am unteren Ende des Schlundes ausgeschieden. Ein merkwürdiges Vorkommen des Enzyms beschrieb Fräulein *Alcock*, nämlich in den Larven von Petromyzon. Bei diesem Tier besteht der Darmkanal aus drei Teilen: einem Schlund, einem Voreingeweide und dem eigentlichen Eingeweide. Das wirksamste Enzym erhielt man aus dem Schlund, während die Häute des Eingeweides wenig oder gar nichts enthielten, wenn sie von der Ausscheidung der sog. Leber befreit wurden, die sich in jenen Teil des Darmkanals ergiefst. Die Drüsengebilde der Haut entsprechen in Bezug auf ihre Verteilung dieser wechselnden enzymatischen Kraft.

Der Hauptbildungsort des Enzyms ist jedoch die sogenannte Leber, deren Ausscheidung zu Lebzeiten in das Eingeweide geht. Fräulein *Alcock* fand, dafs die Haut der Larve ebenfalls das Enzym ausscheidet, wobei die an der Oberfläche liegenden Zellen die wirksamsten sind.

Es wurde sowohl von dieser Forscherin als auch von *Kruckenberg* festgestellt, dafs das Enzym der Leber Pepsin ist. Der Beweis hierfür ist allerdings schwach, und man kann mit Recht zweifelhaft darüber sein, ob es nicht Trypsin ist, wie es bei der sogenannten Leber vieler wirbellosen Tiere der Fall ist. *Levy* sagt jedoch, dafs dieses Organ bei Helix pomatia Pepsin aus-

Digitized by Google

scheidet, und *Bourquelot* will in der Leber verschiedener Cephalopoden Pepsin nachgewiesen haben; in diesem Falle ist es jedoch mit Trypsin vergesellschaftet.

Kruckenberg fand ein proteolytisches Enzym in den Vogeleiern, das bei Gegenwart von 0,1 % Salzsäure wirkt.

Es ist sehr zweifelhaft, ob ein peptisches Enzym im Pflanzenorganismus vorkommt; die meisten der aufgefundenen Enzyme waren tryptischer Natur. Der bemerkenswerteste Fall, der noch nicht aufgeklärt ist, ist die Ausscheidung der Drosera, einer der insektenfressenden Pflanzen. *Darwin*, der zuerst das Vorhandensein des Enzyms feststellte, stellt es genau auf eine Stufe mit dem Enzym des Magensaftes der Säugetiere; da er aber dessen Reaktionsprodukte nicht studierte, mufs man die Sache als noch unentschieden betrachten. Die Beschreibung des Enzyms der Drosera wird in einem späteren Kapitel gegeben.

Aufser im Magensaft wurde das Pepsin auch noch im Blut, in den Muskeln und im Harn der höheren Tiere gefunden. Manche Physiologen betrachten dies nicht als normales Pepsin, sondern sie glauben, dafs auf diesem Wege die Enzyme nach gethaner Arbeit aus dem Körper entfernt werden. *Béchamp* vermutet andererseits, dafs das Pepsin im Blut, das aus dem Fibrin ausgezogen werden kann, von den weifsen Blutkörperchen gebildet und von ihnen in den Blutstrom abgeschieden werde. Dieser Ansicht war auch *Leber*, der den weifsen Blutkörperchen die Fähigkeit zuspricht, die Eiweifssubstanz in den Geweben durch Ausscheidung eines Enzyms zu erweichen und zu lösen. Diese Ansicht kann jedoch kaum als bewiesen gelten.

Das Pepsin zeigt bezüglich seiner Wirkungsweise eine Eigentümlichkeit, auf Grund deren es unter den übrigen Enzymen fast vereinzelt dasteht. Es kann seine spezifische Wirkung nur ausüben in Gemeinschaft mit einer schwachen Säure. Das Pepsin des Magens der Wirbeltiere ist stets in Verbindung mit Salzsäure, welch letztere im Magensaft in einer Menge von 0,2—0,5 % vorhanden ist. Die Vergesellschaftung zwischen beiden ist so eng, dafs die Physiologen mit Vorliebe die proteolytische Flüssigkeit als Pepsinsalzsäure bezeichnen. Andere Mineralsäuren, besonders Salpetersäure und Phosphorsäure, können die Salzsäure ersetzen. Organische Säuren können dieselbe Rolle spielen. *Wroblewski*

Digitized by Google

hat hierüber sehr eingehende Untersuchungen veröffentlicht, wobei er Hunde-, Schweine- und Menschenpepsin verwandte. Er fand, dafs, obwohl Säuren bei allen zur Entfaltung einer Wirkung nötig war, die verschiedenen Pepsine sich bei Gegenwart verschiedener Säuren sich verschieden und auch untereinander keineswegs gleich verhalten. Er stellte das Pepsin nach *Wittes* Glycerin-Methode dar, in jedem Falle aus den Magenschleimhäuten. Bei Schweinepepsin fand er die höchste Wirksamkeit bei Gegenwart von Oxalsäure, von der 20 Volume durch ein Volum Normalalkali neutralisiert wurden. Dann kam Salzsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure, Weinsäure, Milchsäure, Citronensäure, Äpfelsäure, Paramilchsäure, Schwefelsäure und Essigsäure. Bei menschlichem Pepsin war Milchsäure etwas wirksamer als Phosphorsäure.

Die Wirksamkeit des Pepsins wird durch verschiedene physikalische Einflüsse bedingt, z. B. durch die Temperatur. *Klug* giebt an, dafs es noch bei 0° wirke, wenn auch sehr schwach; mit steigender Temperatur wächst die Wirksamkeit, bis diese ihr Optimum bei 50—60° C. erreicht; bei noch höher steigender Temperatur fällt die Wirksamkeit, bei 80° C. erlischt diese ganz, das Enzym wird zerstört. — Andere Forscher haben den günstigsten Punkt weiter herabgesetzt und bei 38—40° C., der Körperwärme also, angenommen. *Langley* behauptet, dafs das Pepsin schnell beim Erhitzen auf 55—57° C. zerstört wird.

Zwischen dem Pepsin der Warmblütler und dem der Kaltblütler scheint, was den günstigsten Punkt anlangt, ein Unterschied zu bestehen. *Hoppe-Seyler* fand, dafs Schweinepepsin Fibrin rascher bei 15° C. als bei 40° C. verdaute. Viele Forscher fanden jedoch, dafs dies beim Froschpepsin nicht der Fall sei.

Die Verdünnung hat einen merklichen Einflufs auf die Wirkung des Pepsins; die besten Ergebnisse erhält man, wenn die Verdauungsflüssigkeit 0,5—0,01 % des Enzyms enthält, was ein ziemlich weiter Spielraum ist. Bei gröfserer oder geringerer Konzentration läfst die Wirksamkeit nach, obwohl Proteolyse noch mit 0,005 % Pepsin stattfindet. Das Hundepepsin ist wirksamer als Schweine- und Ochsenpepsin.

Verschiedene neutrale Salze haben einen ausgesprochenen Einflufs auf die Wirkung des Enzyms, insbesondere Ammonium-

Digitized by Google

sulfat und Kochsalz, letzteres in Mengen über 0,5 %. Alkalische Salze sind ebenfalls in hohem Maſse schädlich; so verursacht z. B. Soda in 0,005prozentiger Lösung bereits eine beträchtliche Zerstörung des Pepsins in ein bis zwei Stunden bei Körpertemperatur. Die Zerstörung des Enzyms geht Hand in Hand mit der Stärke des Alkalis oder alkalischen Salzes, der Einwirkungsdauer und der Menge der vorhandenen Eiweiſsstoffe, wobei letztere bis zu einem gewissen Grade konservierend wirken. Der Schutz ist jedoch bei weitem kein vollkommener. *Langley* und *Edkins* fanden, daſs bei Gegenwart von 2,5 % Pepton 7/8 des Pepsins eines Katzenmagensaftes bei 17° C. durch eine 0,5prozentige Sodalösung innerhalb 60 Sekunden zerstört wurden. Kohlensäuregas ist ebenfalls schädlich, jedoch viel weniger als Alkali. Pepton schützt das Pepsin sehr wirksam gegen dieses Gas.

Zwischen der Wirkung neutraler Salze und alkalischer Salze ist ein groſser Unterschied. Während letztere das Enzym vollständig zerstören, hindern erstere nur dessen Wirkung. Entfernt man sie durch Dialyse oder auf andere Weise, so besitzt das Pepsin noch proteolytische Kraft.

Chittenden und *Amermann* stellten fest, daſs die Entfernung der Produkte der proteolytischen Wirkung wenig oder gar keinen Einfluſs auf den Verlauf der Proteolyse hat.

Die Wirkung des Pepsins ist besonders auf Fibrin und koaguliertes Eiweiſs studiert worden. Die Art der Zersetzung, die in diesem Falle stattfindet, ist bereits besprochen worden. *Chittenden* und *Hartwell* und später *Chittenden* und *Mendel* haben die Proteolyse des krystallisierten Globulins oder Vitellins studiert, das aus dem Hanfsamen dargestellt werden und als typisches Pflanzeneiweiſs gelten kann. Der Verlauf der Einwirkung war in der Hauptsache derselbe wie bei Fibrin oder Eieralbumin; es wurde Syntonin oder eine Art Acid-Albumin zu Beginn der Digestion gebildet, gleichzeitig in kleinen Mengen mit einem, dem Antialbumid entsprechenden unlöslichen Rest. Später konnten Proto- und Deutero-Vitellosen und Peptone entdeckt werden wie in anderen Fällen, doch wurde nur eine sehr kleine Menge Hetero-Vitellose gebildet. Durch Verlängerung der Versuchsdauer unterschieden *Chittenden* und *Mendel* zwei Proto-Vitellosen.

Digitized by Google

Aufser den Eiweifsstoffen kann der Magensaft infolge seines Pepsingehaltes auch noch Gelatine zersetzen. *Tiedemann* und *Gmelin* beobachteten zuerst, dafs dieser Körper unter dem Einflufs des Magensaftes sich verflüssigt und das Gelatinierungsvermögen verliert. *Metzler, Schweder, Etzinger* und andere Forscher erhielten das gleiche Ergebnis mit einer Pepsinlösung.

Der Zersetzungsprozefs der Gelatine wurde von *Chittenden* und *Solley* genau studiert; diese fanden, dafs er ganz ähnlich dem proteolytischen Prozefs desselben Enzyms verläuft. Der Hauptunterschied besteht lediglich in dem Fehlen der Bildung des Acidalbumins. Die Hauptmenge der während der Digestion gebildeten Produkte besteht aus Proto-Gelatose und Deutero-Gelatose; Gelatine-Pepton wird auch gebildet, jedoch nur in kleiner Menge. Diese verschiedenen Körper zeigen Eigenschaften, die denen der bei der Eiweifs-Digestion gebildeten Substanzen ganz ähnlich sind.

Dastre und *Floresco* kamen zu ganz ähnlichen Ergebnissen wie *Chittenden* und *Solley*. Sie fanden auch ähnliche Umsetzungen, wie sie das Pepsin in die Wege leitet und wie sie durch Wasser unter höherem Druck bewirkt werden.

Das Pepsin wirkt auch auf die sogenannten Nucleo-Albumine oder Nucleo-Proteïde, die eine Verbindung von Eiweifs mit dem sogenannten Nucleïn zu sein scheinen; letzteres ist der Hauptbestandteil des Zellkernes. Das Enzym scheint hauptsächlich das Eiweifs der Verbindung anzugreifen, wobei Peptone und Albumosen gebildet werden, gleichzeitig mit einem phosphorhaltigen Rest, der wahrscheinlich wenig verändertes Nucleïn ist. Pepsin wirkt auf die Substanz des Zellkerns nicht ein.

In dieser Hinsicht ist auch die Wirkung des Pepsins auf das Milchkaseïn interessant. Letzteres nahm man allgemein als einen Eiweifsstoff an, der den abgeleiteten Eiweifsstoffen sehr ähnelte. *Lubavin* fand, dafs bei der Digestion mit Pepsin ein phosphorhaltiger Körper unlöslich ausgeschieden wird, der dem Nucleïn sehr ähnlich, wenn nicht mit diesem identisch ist. Diese Thatsache unterstützt *Hammarstens* Ansicht, dafs Kaseïn eher ein Nucleo-Albumin als ein wirkliches Eiweifs ist.

Pepsin verdaut auch Elastin, ist jedoch wahrscheinlich ohne Wirkung auf Mucin.

Digitized by Google

Trypsin.

Das Trypsin ist das charakteristische Enzym der Pankreas-Ausscheidung der höheren Tiere und das Hauptagens, das sich bei der in den Pflanzen sich abspielenden Proteolyse bethätigt. Es unterscheidet sich von Pepsin in zweifacher Beziehung ganz wesentlich. Es bewirkt, wie wir gesehen haben, eine vollkommenere Spaltung der primären Eiweifsstoffe, von denen einige so weit abgebaut werden, dafs krystallinische Amidkörper entstehen. Ferner ist es in seiner Wirkung nicht wie das Pepsin von der Gegenwart eines anorganischen Körpers, z. B. Salzsäure, abhängig. Das Trypsin des Pankreas wirkt sehr kräftig bei Gegenwart einer kleinen Menge eines alkalischen Salzes, z. B. Soda, es besteht jedoch keine bestimmte Beziehung zwischen dem Alkali und dem Enzym. Das Trypsin wirkt auch ebenso in einer neutralen oder schwach sauren Lösung. *Ewald* behauptet, dafs Ochsentrypsin Fibrin bei Gegenwart von 0,3 % Salzsäure verdauen kann. *Mays* kam zu dem gleichen Ergebnis. Die pflanzlichen Trypsine hinwiederum sind am wirksamsten in schwachsaurer Lösung.

Im Pankreassaft ist das Trypsin mit mehreren anderen Enzymen vergesellschaftet; eines derselben, die Pankreas-Diastase, ist bereits besprochen worden. Unter den anderen darin enthaltenen Enzymen befindet sich eine Art Lab, das Milch koaguliert, und Pialyn oder Lipase, die Fette zersetzt. Die beiden letzteren werden später betrachtet werden. Der auf gewöhnliche Weise erhaltene Pankreassaft enthält ebenfalls eine beträchtliche Menge Eiweifsstoffe.

Das Trypsin pflanzlichen Ursprunges ist oft mit anderen Enzymen vergesellschaftet.

Die Darstellung des Trypsins aus Pankreas oder Pankreassaft ist sehr schwierig; man kann zwar einen proteolytischen Auszug aus dem Organ durch Digestion des zerkleinerten Gewebes mit verdünnter Säure oder mit Glycerin bei 35—40° C. erhalten. Ein derartiges Extrakt enthält aber neben dem Trypsin auch die anderen beschriebenen Enzyme.

Die Trennung der drei hauptsächlichsten Verdauungsenzyme Trypsin, Diastase und Pialyn oder Lipase wurde zuerst im Jahre 1862 von *Danilewski* durchgeführt. Er zerkleinerte frisch ge-

Digitized by Google

wonnenen Pankreas im Mörser mit Sand und kaltem Wasser. Nach Entfernung der festen Bestandteile sättigte er die Flüssigkeit mit Magnesia, die das Pialyn in Gemeinschaft mit anderen Bestandteilen des Extraktes fällte. Das Filtrat von dieser Fällung enthielt die Diastase und das Trypsin, und diese wurden getrennt durch Schütteln mit einer alkohol-ätherischen Lösung von Collodium. Der Collodiumniederschlag riſs das Trypsin nieder und lieſs die Diastase in Lösung. Die beiden können auch noch in anderer Weise getrennt werden, indem man den Auszug mit Phosphorsäure ansäuert und dann mit Kalkwasser neutralisiert. Der so gebildete Niederschlag reiſst die Diastase nieder und läſst das Trypsin in Lösung.

Kühne stellte Trypsin in annähernd reinem Zustand nach folgendem Verfahren dar. Das zerkleinerte Gewebe eines frischen Pankreas wurde in Alhohol und Äther maceriert und zwei Auszüge gewonnen. Der erste war sauer und zwar wurde Salicylsäure in der Menge von 0,1 % benutzt. Nach der Maceration, die 4 Stunden lang bei 40° C. durchgeführt wurde, wurde der Auszug durch Auspressen durch ein Leinwandtuch von dem Gewebe getrennt. Dann wurde der Rückstand mit einer 0,25 prozentigen Sodalösung extrahiert und zwar, wie im ersten Falle, bei Körpertemperatur; nach 12 stündiger Maceration wurde die Flüssigkeit wieder abgepreſst. Die beiden Extrakte, die das Enzym zusammen mit viel Eiweiſs enthielten, wurden dann gemischt und dem Ganzen Soda bis zu einem Gehalt von 0,5 % zugegeben. Das Gemisch wurde alsdann der Verdauung überlassen, und zwar bei Gegenwart von antiseptischen Stoffen, bis das Trypsin die Eiweiſsstoffe zu Peptonen abgebaut hatte. Eine etwas längere Digestion war hierzu nötig, manchmal bis zu einer Woche. Hierauf lieſs man die Flüssigkeit in der Kälte 24 Stunden stehen und filtrierte. Dann machte man sie mit Essigsäure schwach sauer und sättigte sie mit neutralem Ammoniumsulfat. Da dieses Reagens Albumosen ausfällt, so war es nötig, daſs diese vorher in Peptone verwandelt waren. Bei Abwesenheit von Albumosen fällt das Ammoniumsulfat das Trypsin in ziemlich reinem Zustand; letzteres wurde auf einem Filter gesammelt, gewaschen und in wenig Alkali gelöst.

Die Methode scheint bis zu einem gewissen Grade nicht

Digitized by Google

einwandfrei. Verschiedene Forscher stellten fest, dafs die vollkommene Umwandlung der Albumosen in Peptone eine sehr schwierige ist und wahrscheinlich nie stattfindet, indem ein gewisser Anteil der Albumose stets unverändert bleibt. *Kühne* fand bei der Untersuchung der Zusammensetzung seines Produktes, dafs es stets beim Aufkochen koaguliertes Eiweifs abschied und nahezu 50% Albumose enthielt. Er schrieb dies der Zersetzung des Enzyms selbst zu, doch scheint eher der unvollkommene Abbau der Albumosen des ursprünglichen Auszuges die Ursache zu sein.

Während Trypsin das kräftigste proteolytische Enzym bei den Wirbeltieren ist, so hat es doch auch unter den niederen Lebewesen grofse Verbreitung. Der Eiweifsabbau ist bei diesen jedoch bislang noch recht unvollständig untersucht, und bei vielen weifs man noch nicht einmal, ob er peptischer oder tryptischer Natur ist. Übergehen wir diese und beschäftigen wir uns für den Augenblick nur mit denen, deren Ausscheidungen untersucht worden sind, so sehen wir, dafs *Fredericq* ein Enzym aus gewissen Schwämmen dargestellt hat, das Eiweifs in Pepton und zum Teil in Leucin und Tyrosin umwandelt. Dieselben Körper traf er in gewissen Echinodermata an. In den „Magen“ von Uraster, die in den Strahlen des Tieres liegen, findet sich eine Verdauungsflüssigkeit, die sich genau so verhält wie Pankreassaft. Sie zersetzt Fette, verzuckert Stärke und löst koaguliertes Eiweifs. *Fredericq* zog das Enzym in der Weise aus, dafs er die Gewebe nach der Entwässerung mit Alkohol mit Glycerin behandelte. So dargestellt, verdaute es Muskelfaser unter Bildung von Leucin und Tyrosin. Er giebt an, dafs sie in alkalischer Lösung sehr stark, in neutraler weniger und in saurer Lösung kaum wirksam ist. Bei den Coelenteraten findet man ausgesprochene Drüsenzellen im Endoderm, die Körperflüssigkeit besitzt Verdauungseigenschaften.

Bei den Würmern ist das Eingeweide zum Teil umgeben von einem gelblichen Drüsengewebe, das in seiner Wirkung pankreatisch sein soll. *Fredericq* zog aus dem entwässerten Gewebe des ganzen Wurmkörpers ein Enzym aus, das Fibrin sowohl in saurer, als alkalischer Lösung von verschiedener Stärke verdaute. Am vorteilhaftesten war eine 0,6—1,2 prozentige Salzsäure-

Digitized by Google

lösung. Obwohl das Extrakt in neutraler Lösung weniger wirksam war, so konnte er doch eine schwache Verdauung bewirken. Später schnitt *Fredericq* das Eingeweide des grofsen Erdwurms aus und fand in der Höhle eine schwach alkalische Flüssigkeit, die Fibrin verdauen konnte. Diese Flüssigkeit war die Ausscheidung der Drüsenzellen, die das Eingeweide bedecken. *Griffiths* fand unter den Verdauungsprodukten des Wurmenzyms Indol. Die Wurmdrüsen scheinen daher ein tryptisches Enzym zu enthalten.

In den Insekten findet sich aller Wahrscheinlichkeit nach auch Trypsin; *Griffiths* fand, dafs der Magen der Blatta eine pankreatische Wirkung hat. Im Magen sowohl der Larve als auch der geflügelten Individuen gewisser Lepidopteren befinden sich Drüsenbündel, die einen Saft aussondern, der in proteolytischer Beziehung dem Pankreas der Wirbeltiere ähnelt. Abelous und Heim entdeckten Trypsin in den Eiern gewisser Krustaceen, die auch Diastase enthielten.

Die sog. Leber der Krustaceen und Mollusken scheint auf alle Fälle zum Teil eine Verdauungsdrüse vom Typus des Pankreas zu sein. *Bourquelot* studierte sie sehr sorgfältig bei den Cephalopoden und schlofs, dafs sie sowohl Pepsin als auch Trypsin ausscheidet. *Fredericq*, der sie bei vielen Familien studierte, giebt an, dafs bei allen die von der Leber abgesonderte Flüssigkeit Stärke verzuckern, Fette spalten und Fibrin unter Bildung von Leucin und Tyrosin lösen kann. Das Enzym kann aus dem Gewebe durch Entwässern mit Alkohol und darauffolgendes Ausziehen mit Glycerin nach den Methoden von *von Wittich* und *Krawkow* gewonnen werden, die bereits beschrieben wurden. Bei den Tunicaten sollen die Röhrchen, die über den Rand der Eingeweide hinaus sich verzweigen, eine pankreatische Drüse sein.

Das Vorkommen des Trypsins im Pflanzenreich wird später behandelt.

In den Bedingungen der Wirkung ähnelt das Trypsin sehr dem Pepsin; es wird in ähnlicher Weise von der Temperatur und selbst durch kleine Überschüsse von Säuren oder Alkalien beeinflufst. Pankreatisches Trypsin wird gestört durch 0,1 % Salzsäure und gänzlich gehemmt durch 0,05 % Milchsäure. Neutrale Salze beeinflussen es stärker als das Pepsin.

Digitized by Google

Die Entfernung der gebildeten Umwandlungsprodukte ist von bedeutendem Einflufs auf den Verlauf der Proteolyse. *Lea* hat hierüber sehr sorgfältige Untersuchungen angestellt, wobei er Trypsin, nach *Kühne*scher Methode dargestellt, benutzte; er führte zwei Versuchsreihen durch, eine in Glasflaschen und die zweite im Dialysierrohr, das in einer 0,25 prozentigen Sodalösung hing, die mit etwas Thymol versetzt war. Er fand, dafs die typische Zerstörung des Fibrins viel früher in dem Dialysator als in der Flasche eintrat, und dafs in letzterem Falle die Umwandlung niemals so vollständig war, indem zum Schlufs noch mehr unverändertes Antialbumid übrig blieb. Auf der anderen Seite war die Bildung von Leucin und Tyrosin unter sonst gleichen Bedingungen in der Flasche immer gröfser als im Dialysator.

Der Verlauf der tryptischen Zersetzung der primären Eiweifsstoffe ist bereits geschildert worden. An dieser Stelle sei auf einen Unterschied zwischen dem Trypsin und dem Pepsin in Bezug auf die Proteolyse des Fibrins hingewiesen. Wenn man Fibrin mit Pepsin verdaut, so schwillt es unter dem Einflufs der Salzsäure, mit der das Enzym vergesellschaftet ist, auf und wird dann gelöst, wobei die Flüssigkeit bis nahe zum Ende der Digestion klar bleibt, wo das gebildete Antialbumid sich als körniger Niederschlag ausscheidet. Bei der Einwirkung von Trypsin verläuft der Vorgang anders. Das Fibrin schwillt nicht an und wird nicht durchscheinend, sondern wird allmählich korrodiert anstatt gelöst, so dafs die Verdauungsflüssigkeit stets trüb und mit feinkörnigen Massen angefüllt ist.

Aufser Leucin und Tyrosin werden durch die Wirkung des Trypsins noch andere krystallinische Körper gebildet. *Nencki* fand unter diesen Xanthin, Guanin, Hypoxanthin und Adenin-Hypoxanthin. Er fand auch einen Körper, den er Proteino-Chromogen nannte, und der aus zwei Substanzen besteht, die er jedoch nicht vollständig trennen konnte. Aus der Bromverbindung der einen von ihnen stellte er Skatol, Pyrrolin und Indol dar, und zwar durch Schmelzen mit Kalihydrat. Bei der pankreatischen Verdauung, wie sie sich natürlich im Darm vollzieht, kommen sowohl Skatol, als Indol in den unteren Teilen des Organs vor, nachdem die Bakteriengärung eingesetzt hat. Die Bildung dieser Körper ist nicht ausschliefslich auf letztere

Digitized by Google

zurückzuführen, da sie bei der bakteriellen Zersetzung des Eiweifses aufserhalb des Körpers nicht entstehen. Sie mögen im Darm infolge der Wirkung der Mikroben auf die von *Nencki* beschriebenen Substanzen entstehen.

Während der Trypsinwirkung bildet sich auch noch ein Körper, der für die pankreatische Verdauung sehr charakteristisch ist; er färbt sich mit Brom- oder Jodwasser blafsrot. Auch Asparaginsäure hat man gefunden.

Trypsin kann Mucin zersetzen, das der Wirkung des Pepsins widersteht; dagegen kann es das Collagen des Bindegewebes nicht lösen, obwohl es die Gallerte verdauen kann, in die dieses durch andauerndes Kochen mit Wasser übergeführt werden kann. Die Abbauprodukte der Gelatine sind ähnlich den von Pepsin gebildeten. Elastin wird mehr oder weniger rasch von Trypsin gelöst, wobei Körper gebildet werden, die ihren Reaktionen nach den Verdauungsrückständen der Eiweifsstoffe ähneln. Es ist nicht gewifs, ob die Peptonstufe erreicht wird.

Eine merkwürdige Einwirkung des Pankreassaftes beobachtete zuerst *Roberts*; später bestätigten andere Forscher diese Beobachtung. Milch ist eine Emulsion von Fett in einer Flüssigkeit, die Eiweifsstoffe, Kohlenhydrate und Salze enthält. Der Haupteiweifsstoff ist das Kaseïn, das nach seinen Reaktionen zu den abgeleiteten Eiweifsstoffen gehört. Es ähnelt diesen so sehr, dafs man es früher für ein Alkali-Eiweifs hielt. Dieser Körper unterscheidet sich vom primären Eiweifs oder dem Globulin dadurch, dafs er in der Siedehöhe nicht gerinnt. *Roberts* zeigte, dafs eine kurze Digestion der Milch mit Pankreassaft und darauffolgendes Kochen das Kaseïn in der Form eines Schaumes oder Koagulums ausscheidet. Er vermutet, dafs dies auf die Wirkung des Trypsins zurückzuführen ist und ein sehr frühes Stadium der Proteolyse darstellt. Bei längerer Digestion mit Pankreassaft verschwindet diese Eigenschaft, und dann lassen sich die gewöhnlichen Zersetzungsprodukte des Kaseïns, Proteosen etc., nachweisen. *Roberts* nannte diesen aus dem Kaseïn gebildeten neuen Körper, der beim Kochen koagulierte, „Metakaseïn“. Seine Angaben sind nachgeprüft worden; die Beobachtungen werden jetzt anders gedeutet. Spätere Forscher nehmen an, dafs die Wirkung nicht mit der Proteolyse des Trypsins zusammenhängt, sondern dafs das Metakaseïn von dem Labenzym

Digitized by Google

unter besonderen Bedingungen gebildet wird. Dieser Punkt wird noch später erörtert werden.

Die intracellulare proteolytische Verdauung findet sich im Tierreich nicht so häufig wie die diastatische Verzuckerung. Man weifs noch nicht einmal, ob sie durch peptische oder tryptische Enzyme bewirkt wird, und wie weit dabei das Plasma direkt beteiligt ist. *Metschnikoff* berichtet über Digestionen, die in den Zellen des Mesodemes von Synapta und Phyllirhoë sich abspielen, und hat aufserdem behauptet, dafs die weifsen Blutkörperchen der höheren Wirbeltiere Verdauungsvermögen aufweisen. *Leidy* hat das Verschlucken einer Amöbe durch eine gröfsere einer anderen Art beschrieben, und andere Forscher haben ähnliche Thatsachen mitgeteilt. Alle berichten übereinstimmend, dafs die verschluckte Substanz eine Zeitlang in einer Vakuole innerhalb der tierischen Substanz liegen bleibt, offenbar von einer Verdauungsflüssigkeit umgeben.

Fräulein *Greenwood* hat den Verdauungsprozefs einiger der niedersten Formen beschrieben. Sowohl bei Amöba als auch bei Actinosphaerium hat sie das Verschlucken fester Futterteilchen und die darauf folgenden Veränderungen dieser Teilchen beobachtet. Die verschluckte Substanz wird von einer Flüssigkeit in oft nicht unbeträchtlicher Menge umgeben, so dafs sie in einer Vakuole in dem Tierkörper liegt. Wenn der verschluckte Körper zur Nahrung nicht verwendbar ist, so verschwindet die Vakuole bald; ist sie aber verdaulich, so wird sie zersetzt, aber nicht durch die direkte Berührung mit der lebenden Substanz, sondern durch eine Substanz, die aus dem Protoplasma in die Vakuole übergeht, die auf diese Weise zu einem Verdauungsraum wird und eine Ausscheidung aus der lebenden Substanz empfängt. Dieses Sekret ist wahrscheinlich nicht sauer, es verdaut jedoch die verschluckte Nahrung, die nach einiger Zeit verschwindet. Ist die verschluckte Substanz eine von einer Zellmembran umgebene Alge, so wird diese Membran nicht gelöst, doch wird ihr Eiweifsinhalt verdaut. Hieraus geht deutlich hervor, dafs in diesen Fällen die Verdauung durch ein Sekret durchgeführt wird, das durch die Membran zu diffundieren vermag und nicht etwa durch die Berührung mit dem Plasma selbst. Die Thatsache, dafs un-

Digitized by Google

verdauliche Substanzen die Bildung dieser Verdauungsvakuole nicht bewirken, deutet darauf hin, dafs die Aufnahme von Futter ein Anreiz für die Ausscheidung eines Verdauungssaftes ist.

Bei Actinosphaerium kann man bald nach dem Verschlucken des Futters deutliche Körnung eintreten sehen und zwar da, wo die lebende Substanz die Beute umgiebt. Diese Körnung tritt nicht auf, wenn eine unverdauliche Substanz verschluckt wird. Fräulein *Greenwood* meint, dafs das Auftreten dieser Lösung für eine sekretorische Thätigkeit bezeichnend sei.

Es ist bemerkenswert, dafs verschiedene Forscher die Angabe machen, dafs die sich um die verschluckte Substanz bildenden Vakuolen häufig eine saure Flüssigkeit enthalten. Unter anderm sagt *Engelmann*, dafs Lackmus-Partikelchen sich röten, wenn sie von Paramoecium, Stylonichia und einigen Amoebenarten verschluckt werden.

Bei Carchesium, einer Vorticellide, kann man die Verdauungsvorgänge noch viel deutlicher beobachten. Fräulein *Greenwood* beschreibt die Beobachtungen, die man anstellen kann, wenn man das Tier mit ganz fein gemahlenem Hühnereiweifs füttert. Es wird gleich eine ganze Anzahl der Partikelchen auf einmal verschluckt; man kann sie dann in einer Vakuole in dem Fleisch des Tieres sehen. Sie rücken vom Mund nach den tiefer gelegenen Stellen des Tieres, lagern sich zusammen und verlieren die sie umgebende Flüssigkeit. Sie werden dann eine Zeitlang aufgespeichert, manchmal länger als eine Stunde; dann bilden sich aufs neue Vakuolen um sie mit frisch secernierter Flüssigkeit, die auf die Eiweifsstoffe von besonderer Wirkung ist. Die eingeschlossenen Teilchen werden allmählich gelöst, die Vakuole, in der sie eingeschlossen sind, bewegt sich dann langsam nach der Gegend hin, wo die unverdauten Anteile ausgestofsen werden.

Der Vorgang der Sekretion der proteolytischen Enzyme in den Zellen der Milchdrüsen verläuft ebenso, wie der der Diastasebildung in den Speicheldrüsen. Die Struktur des Pankreas und der Magendrüsen ist der der Speicheldrüsen ähnlich. Im Ruhezustand enthalten die Drüsen besondere, durchsichtige Körnchen, die sich so anhäufen können, dafs die ganze Zelle undurchsichtig wird oder die sich mehr oder weniger auf der Seite, die an das Lumen der Drüse anstöfst, ablagern. Im Pankreas haben wir so

Digitized by Google

zwei wohl markierte Zonen: die äufsere ist klein, aber durchsichtig, während die innere undurchsichtig ist. Wenn eine Sekretion stattfindet, so wird die Körnung weniger deutlich; die Körnchen ziehen sich vom äufseren Teil der Zellen nach dem Lumen der Drüse zurück, und die Zellen weisen einen scharfen Umrifs auf. Am Ende des Prozesses sind die Zellen fast frei von Körnchen. Die Körnchen bilden sich dann nach und nach wieder, bis der Ruhezustand wieder erreicht ist, wobei die Zellen gleichzeitig etwas gröfser werden. Ein Vergleich der der Drüse entnommenen Zellen während der verschiedenen Sekretionsvorgänge führte zu der Auffassung, dafs der Sekretionsvorgang aus drei wohl charakterisierten Phasen besteht: 1. Dem Wachstum der Zelle auf Kosten des durch die Lymphe zugeführten Materials. 2. Der Bildung der Körnchen aus dem Zellplasma. 3. Der Ausstofsung derselben in Gemeinschaft mit einer gewissen Menge Flüssigkeit, in der sie mehr oder weniger vollständig gelöst werden. In einigen Drüsen folgen diese Vorgänge mehr oder weniger aufeinander; bei anderen scheinen sie sich gleichzeitig, jedoch in verschiedener Stärke abzuspielen. In solchen Zellen können die hellen und körnigen Zonen nicht deutlich erkannt werden, obwohl der Grad der Körnung von Zeit zu Zeit wechselt.

Die Körnchen scheinen nicht das Enzym selbst zu sein, sie scheinen jedoch aus Substanzen zu bestehen die leicht und vollständig in dieses übergehen können. Wenn man einen frischen, sofort nach dem Tode entnommenen Pankreas mit Wasser oder Glycerin extrahiert, so ist der Auszug fast ohne Wirkung auf Eiweifsstoffe. Läfst man ihn jedoch, anstatt sogleich zu extrahieren, erst 24 Stunden bei warmer Temperatur stehen, oder erwärmt man ihn kürzere Zeit mit verdünnter Essigsäure und extrahiert dann, so hat das Extrakt eine ausgesprochene proteolytische Wirkung. Der unwirksame Auszug aus dem frischen Pankreas kann auch durch schwaches Ansäuern und Stehenlassen bei 40° C. wirksam gemacht werden. Die Zellen enthalten das Enzym in der Form eines Zymogens, das durch die Säure leicht in das wirksame Enzym übergeführt wird. Das Zymogen des Pankreas kann auch durch Hindurchleiten eines Sauerstoffstromes während ungefähr 15 Minuten durch den neutralen Auszug wirksam gemacht werden. Dafs die Körnchen thatsächlich dieses Zymogen enthalten, er-

Digitized by Google

scheint dadurch wahrscheinlich, dafs die Menge des Enzyms, das gebildet werden kann, der Körnung proportional ist.

Es unterliegt keinem Zweifel, dafs diese Veränderungen von der Nerventhätigkeit reguliert werden, wie bei der Speicheldrüse, jedoch sind die Nervenimpulse noch nicht so genau studiert. Reizung des verlängerten Markes vermehrt die Ausscheidung des Pankreas, diese ist jedoch durchaus nicht abhängig von der Nervenunterstützung aus dem Central-Nervensystem. Wenn alle nach der Drüse gehenden Nerven durchschnitten werden, so wird die Sekretion nicht wesentlich beeinflufst. Bei einigen Tieren findet wahrscheinlich nur ein vom Nerven-Mechanismus beeinflufster Reflex statt, denn die Sekretion beginnt unmittelbar, nachdem die Nahrung vom Magen aufgenommen worden ist.

Durch die Nahrungsaufnahme wird sowohl die Sekretion des Pepsins, als auch die des Trypsins hervorgerufen. *Schiff* fand, dafs bei Einführung eines unlöslichen Eiweifses, z. B. von Fibrin oder koaguliertem Eiweifs, in den Magen eines fastenden Tieres kein Pepsin abgeschieden wurde und das Eiweifs unverdaut blieb. Wurden aber mit letzterem gewisse lösliche Substanzen, denen er den Namen Peptogene beigelegt hat, eingeführt, so wurde Pepsin unmittelbar nach der Aufnahme abgeschieden. Unter diesen Peptogenen erwähnt *Schiff* Dextrin, Fleischextrakt, Gelatine und Pepton. Er fand, dafs sie bei der Injektion ins Blut ebenso wirksam waren, als bei irgend einer anderen Art und Weise der Aufnahme. Ihre Wirkung beruht daher offenbar nicht lediglich auf ihrer Anwesenheit im Magen, sondern sie müssen chemisch und nicht mechanisch auf die Drüsenzellen wirken. Möglicherweise wirken sie direkt auf das Plasma, wodurch sie die nötigen Ernährungsvorgänge in der Drüse zu stande bringen, oder aber, sie können indirekt wirken, indem sie einen Nervenmechanismus in der Drüse oder in der Magenwand reizen und auf diese Weise die Sekretion bewirken. Einige Physiologen sind der Ansicht, dafs im Pankreas und in den Speicheldrüsen zwei Arten von Nervensträngen sind; der eine bewirkt die Bildung der Enzyme, der andere entlädt sie während der Thätigkeit der Drüse. Die Ansicht beruht weniger auf einem experimentellen Beweis, als auf einer Analogie mit der Speicheldrüse, bei der eine Nervenwirkung wahrscheinlich ist.

Digitized by Google

Zwischen den beiden Enzymen herrscht ein deutlicher Unterschied in Bezug auf den Einfluſs, den Säuren, Alkalien und neutrale Salze darauf ausüben. Pepsin kann Proteolyse nur in Gegenwart von verdünnter Säure bewirken; im Magensaft ist sie mit der Salzsäure in Mengen von 0,2—0,6 % eng vergesellschaftet. Pankreatisches Trypsin dagegen wird durch verhältnismäſsig kleine Mengen freier Säure zerstört. Trypsin wird in seiner Wirkung durch die meisten Salze in kleiner Menge, hauptsächlich alkalische Salze unterstützt; unter diesen wirkt Soda am günstigsten, die besten Ergebnisse erhält man mit 0,9—1,2 % des Salzes. Dieser Körper ist für das Pepsin höchst schädlich, durch 0,5 % wird das ganze Enzym in weniger als 15 Sekunden zerstört. Die Gegenwart löslicher Eiweiſsstoffe verringerte den Grad der Schädlichkeit, doch nicht sehr wesentlich, selbst 2,5 % Pepton verhindern sie nicht. Das Pepsin des Frosches wird weniger leicht zerstört als das der Säugetiere.

Neutrale Salze im Überschuſs wirken auf beide Enzyme schädlich, Pepsin wird jedoch schneller beeinfluſst als Trypsin. Die Wirkung des letzteren wird nach *Edkins* unterstützt durch die Gegenwart von 1—2 % Kochsalz, jedoch sehr gehemmt durch 8 % des Salzes.

Ein noch charakteristischerer Unterschied zwischen Pepsin und Trypsin ist in ihrem bezüglichen Eiweiſsspaltungsvermögen begründet. Pepsin kann den Eiweiſsabbau nur bis zum Pepton durchführen, während Trypsin das Pepton bis zur vollständigen Zersetzung des Eiweiſses spalten kann. Die Anfangsstadien des Eiweiſsabbaues sind in beiden Fällen nicht wesentlich verschieden, und die Hauptursache dieses Unterschiedes scheint darin begründet zu sein, daſs das eine Enzym in saurer, das andere in alkalischer Lösung wirkt.

Der Peptonisationsvorgang durch Pepsin ist ein langsamer und unvollkommener Prozeſs; die Menge der gebildeten Proteosen und Peptone ist gegen Ende der Digestion im allgemeinen 65 bezw. 30 %. *Chittenden* und *Amerman* glauben, daſs eine vollständige Peptonisation weder auf künstlichem noch auf natürlichem Wege mit Magensaft erzielt werden kann. Die Wirkung des Pepsins ist eher ein Vorstadium der proteolytischen Verdauung, eine Vorbereitung für die im Darm zu stande kommende weit

Digitized by Google

kräftigere Umwandlung durch das Trypsin. Das ist zwar keine neue Ansicht; sie wurde ursprünglich von *Claude Bernard* geäufsert. Sie wird durch die Thatsache unterstützt, dafs bei den niederen Tieren das Pepsin selten anzutreffen ist, indem diese als einziges proteolytisches Enzym ein tryptisches ausscheiden. Trypsin wirkt energischer als Pepsin; es verwandelt primäre Eiweifsstoffe rasch in Proteosen und diese mehr oder weniger vollkommen in Peptone. Die einzige rasche Umwandlung, die das Pepsin bewirkt, ist die der primären Proteosen; von da ab wird die Wirkung langsam und unvollständig.

Digitized by Google

Kapitel XIII.

Proteolytische Enzyme (Fortsetzung). **Pflanzentrypsine.**

Es ist nicht sicher, ob das Pepsin im Pflanzenreiche vorkommt, alle proteolytischen Enzyme, welche genau untersucht worden sind, vermögen die Hydrolyse bis über das Stadium der Peptone hinaus durchzuführen. Die Arbeiten früherer Forscher weisen eine sorgfältige Prüfung der Zersetzungsprodukte auf; deswegen ist es für den Augenblick ungewifs, ob einige der Enzyme zur peptischen Gruppe gehören oder nicht.

Die hauptsächlichsten Enzyme der proteolytischen Klasse, die eingehend untersucht wurden, sind Papaïn, erhalten aus dem Saft von Carica papaya, Bromelin aus der Ananasfrucht, das Trypsin der gekeimten Samen und das Enzym der Ausscheidung von Nepenthes, einer der sogenannten Krugpflanzen. Mehrere andere kommen noch in verschiedenen Pflanzen vor, wir kennen sie aber noch sehr unvollständig.

Bromelin.

Obgleich dieses Enzym nicht zuerst untersucht wurde, so sind wir darüber augenblicklich am besten unterrichtet, und da es für die meisten der Enzyme typisch zu sein scheint, so ist es ratsam, es in erster Linie zu besprechen. Es kommt in grofser Menge im Safte der Ananas (Ananassa sativa) vor und hat im Handel Bedeutung erlangt. Im Jahre 1891 machte *Marcano* zuerst darauf aufmerksam; seitdem ist es sehr eingehend von *Chittenden* und seinen Schülern in Amerika untersucht worden, die ihm den Namen Bromelin nach der natürlichen Ordnung, zu der die Ananas gehört, beilegten.

Die Frucht ist aufserordentlich saftreich; jede Ananas von Durchschnittsgröfse liefert etwa einen Liter Saft. Dieser ist deutlich sauer; der Säuregehalt entspricht einer 0,45 prozentigen Salzsäure.

Digitized by Google

Das proteolytische Enzym ist in dem Saft mit einem Lab- oder Milchgerinnungs-Enzym vergesellschaftet, gerade wie das Pepsin im Magensaft der Tiere.

Der Saft enthält zwei Eiweifsstoffe, von denen der eine eine Proto-Proteose und der andere entweder eine Hetero-Proteose oder ein Globulin zu sein scheint. Ersterer ist hauptsächlich mit dem Bromelin vergesellschaftet und koaguliert beim Erhitzen des Saftes auf 75° C. Wird letzterer vor dem Erwärmen neutralisiert, so wird der Koagulationspunkt auf 82° C. erhöht. Das zweite Proteïd ist hauptsächlich mit dem Lab vergesellschaftet und wird erst beim Kochen des Saftes koaguliert.

Das Bromelin kann aus dem Ananassaft durch Sättigen mit Krystallen von Kochsalz, Magnesiumsulfat oder Ammoniumsulfat abgeschieden werden. Das erste dieser Salze giebt die besten Resultate; die Verdauungskraft der drei Präparate wurde festgestellt, indem man je 0,05 g derselben 6 Stunden lang bei 40° auf 10 g feucht koaguliertes, in 100 ccm Wasser suspendiertes Eieralbumin einwirken liefs. Das Kochsalzpräparat verdaute unter diesen Umständen 27,6 % des Eiweifses, das Magnesiumsulfatpräparat 14,1 % und das Ammoniumsulfatpräparat nur 12,3 %. Das Enzym verliert durch die Aussalzung etwas an Wirksamkeit; der neutralisierte Saft ist stets proteolytisch wirksamer als die Lösungen der verschiedenen Salzfällungen unter sonst gleichen Bedingungen. Die Wirkung des Enzyms ist in neutraler Lösung etwas anders als in saurer Lösung, und ihr Verlauf ist bei der Einwirkung auf verschiedene Eiweifsstoffe ein wechselnder. *Chittenden* und seine Schüler haben die Kochsalzaussalzung als die kräftigste bei ihren meisten Versuchen benutzt.

Wurde Fibrin zu den Versuchen benutzt, so nahm die Einwirkung folgenden Verlauf:

300 g feuchtes Fibrin wurden mit 2500 ccm 0,025 prozent. Salzsäure und 0,25 g Bromelin 5 Stunden lang auf 40° C. erwärmt: Das Fibrin war alsdann bis auf einen kleinen flockigen Rückstand vollständig gelöst. Das Filtrat von diesem Rückstand schied beim Neutralisieren einen geringfügigen Niederschlag aus. Nach der Filtration wurde die neutralisierte Flüssigkeit kurze Zeit gekocht; ein schweres Koagulum schied sich aus, das sich in verdünnten Säuren und Alkalien löste. Eine weitere Fällung wurde

Digitized by Google

in dem von dem koagulierten Eiweifs abfiltrierten und konzentrierten Filtrat durch Zusatz von Alkohol erhalten, und aus dem alkoholischen Filtrat schieden sich bei geeigneter Behandlung Leucin und Tyrosin in grofsen Mengen ab. Der ursprünglich zurückgebliebene Rückstand bestand aus einem Antialbumid gemischt mit einer Proteose, welche der weiteren Einwirkung des Enzyms widerstand. Der Neutralisationsniederschlag war wahrscheinlich kein Acid-Albumid, sondern eine Art Hetero-Proteose, da sie beim Stehen in Dys-Proteose überging. Das in der Hitze ausgefällte Eiweifs war eine Hetero-Proteose, die durch Neutralisation nicht gefällt wurde. Bei verschiedenen Versuchen wechselte die Menge des Neutralisationsniederschlags und des Koagulums, was darauf schliefsen läfst, dafs beide dasselbe Proteïd sind, das sich nicht immer in derselben Weise in Bezug auf die Flüssigkeit verhielt. Der Niederschlag mit Alkohol war ein Gemisch von Proteosen und Peptonen. Löste man den Niederschlag in Wasser, so konnte man erstere mit Ammoniumsulfat aussalzen, wobei sich herausstellte, dafs erstere ein Gemisch von Proto-, Hetero- und Deutero-Proteosen waren. Das Pepton war fast, wenn nicht ganz, Antipepton. Somit war erwiesen, dafs der Wirkungsverlauf fast identisch war mit dem des pankreatischen Trypsins, nur wurde kein Hemipepton gebildet. Die Menge krystallinischer Amide zeigte an, dafs letzteres ganz zersetzt worden war.

Wurde die Digestion in neutraler Lösung bei Gegenwart von 1 % Kochsalz durchgeführt, so war der Wirkungsverlauf ein ähnlicher; jedoch war die Menge des koagulierbaren Eiweifses gröfser, und letzteres bestand hauptsächlich aus Dys-Proteosen, die bei weiterer Digestion Deutero-Proteosen lieferten. Der gröfste Teil des Peptons war Antipepton, doch schien auch etwas Hemipepton vorhanden zu sein. Die mit dem Pepton vermischten Proteosen enthielten keine Hetero-Proteosen, und das Leucin und Tyrosin waren in geringerer Menge vorhanden als bei der sauren Digestion.

Fibrin wurde in neutraler Lösung nicht so leicht verdaut als in saurer, und im ersteren Falle war die Gegenwart eines Salzes, wie z. B. Kochsalz, fast wesentlich für die Thätigkeit des Bromelins.

Wurde anstatt des Fibrins Eieralbumin genommen, so lagen die Verhältnisse etwas anders. Das koagulierte Eiweifs von

Digitized by Google

3 Dtz. Eiern wurde mit 2 l Wasser und 0,8 g Bromelin 40 Std. bei 40° C. unter antiseptischen Vorsichtsmaſsregeln digeriert. Es blieb ein kleiner unlöslicher Rückstand übrig, der aus Anti-Albumin und etwas unverdautem Eiweiſs bestand. Die Flüssigkeit war schwach sauer geworden, aber bei der Neutralisation entstand kein Niederschlag, auch wurde beim Kochen kein Koagulum gebildet. Alkohol fällte ein Gemisch von Proteosen und Peptonen, das Filtrat enthielt Leucin und Tyrosin. Es hatte sich sehr wenig Proto- und Hetero-Proteose gebildet; diese sind wahrscheinlich bei dem etwas lange dauernden Digestionsvorgang weiter abgebaut worden; dagegen waren reichliche Mengen Deutero-Proteose vorhanden. Auch die Wirkung des Bromelins auf Myosin wurde geprüft. Es verdaute dieses Eiweiſs am besten in 0,025 prozentiger Salzsäurelösung. Der Abbauprozeſs zeigte gegen andere einige Unterschiede. Kurz nach dessen Beginn wurde die Lösung dick und halb gallertartig, wie es schien durch die Ausscheidung eines Acid-Albumins. Mit dem Fortschreiten des Prozesses verschwand dies aber. In anderer Hinsicht verhielt sich das Myrosin wie die anderen Eiweiſskörper, es lieferte Proteosen, Peptone und Amide.

Sorgfältige quantitative Analysen der während des Verdauungsprozesses gebildeten Körper ergaben eine stufenweise Abnahme im Stickstoffgehalt, was auf eine allmähliche Abspaltung von stickstoffhaltigen Radikalen hinweist. So enthält Myrosin 16,86 % Stickstoff, der Neutralisationsniederschlag 15,8 und die Deutero-Albumose 13,9 %. Eigentümlicherweise enthielt das Pepton aus Albumin 14,5, das aus Myosin dagegen dargestellte 15,7 % Stickstoff. Der Einfluſs wechselnder Mengen verschiedener Säuren auf die Wirkung des Bromelins auf Fibrin ist aus nebenstehender Tabelle ersichtlich: (S. Tabelle S. 201.)

Gegen Eieralbumin, das in der Hitze koaguliert war, war Bromelin in neutraler Lösung am wirksamsten; kleine Mengen Salzsäure (0,012 bis 0,025 %) hinderten es nicht, ebensowenig 0,025 % Soda; organische Säuren hatten eine verschiedene Wirkung; 0,1 % Citronensäure verminderte seine Wirkung im Verhältnis von 31 : 12,5.

Mit rohem Eieralbumin zeigten verschiedene Säuren weitere Abweichungen. Salzsäure gab bei einer Versuchsreihe, in der

Digitized by Google

Benutzte Säure	Mit dem Kochsalzpräparat	Mit dem Magnesiumsulfat-Präparat	Mit dem Ammonium-sulfat-Präparat
Keine	Enzym fast wirkungslos	Wie beim Kochsalzpräparat	Wie beim Kochsalz-Präparat
Salzsäure	Mit 0,012 % wirksam; die Wirksamkeit nimmt mit wachsender Säuremenge zu bis zu 0,025 %, wird dann nicht geändert bis 0,05 %, nimmt dann ab und erlischt bei 0,1 %	Wächst bis zu 0,05 %; darüber hinaus nimmt die Wirksamkeit ab	Wie beim Magnesium-sulfat-Präparat
Essigsäure	Fast unwirksam bis zu 0,25 %, wird dann wirksam und bleibt so bis zu 1 %	—	Wie beim Kochsalz-Präparat
Citronensäure	Die Wirksamkeit beginnt mit 0,03 %; bleibt gut bis zu 0,12 %, nimmt dann ab und wird mit 1 % unwirksam	—	Höchste Wirksamkeit mit 0,5—1,5 %
Weinsäure	Schwache Wirkung bei 0,06 %; Maximum bei 0,15 bis 1 %	—	—
Oxalsäure	Wirksam nur bei 0,12 bis 0,25 %; unwirksam bei 1 %	—	Höchste Wirksamkeit bei 0,25—0,5 %

10 ccm Eiweifs, 0,05 g Bromelin und 90 ccm Wasser 16 Std. bei 40° in Gegenwart von Thymol digeriert wurden, folgende Resultate:

	Neutral	0,012 % Salzsäure	0,025 % Salzsäure	0,1 % Salzsäure
Verdaut:	16,6 %	17,3 %	21,9 %	6,2 %

Soda war in etwas gröfserem Umfange schädlich; bei Gegenwart von 0,05 % wurden nur 0,8 % verdaut.

In einer andern Versuchsreihe, die mit derselben Menge Bromelin und Eiweifs ausgeführt wurde, wurden die Wirkungen anderer Säuren geprüft und zwar mit folgendem Ergebnis:

	Neutral	0,20 % Weinsäure	0,5 % Weinsäure	0,1 % Oxalsäure
Verdaut %:	35,5	23,8	16,6	19,0

	0,1 % Citronensäure	0,2 % Citronensäure
Verdaut %:	18,6	18,7

Der Einflufs neutraler Salze auf die Wirkung des Bromelins wechselte wiederum mit der Darstellungsweise des benutzten En-

Digitized by Google

zyms, mit dem zu verdauenden Eiweifs und mit der Reaktion der Verdauungsflüssigkeit. In neutraler Lösung wurde die Fibrinverdauung durch das Kochsalzpräparat bei Gegenwart von 1 bis 3 % neutraler Salze gefördert, bei den anderen Präparaten schwankte die Salzmenge zwischen 1 und 5 %, gröfsere Mengen jedoch schädigten die Wirkung. Neutrale Salze schädigten saure Digestionen nur dann, wenn sie in grofser Menge zugegen waren.

Sie erleichterten nicht die neutrale Verdauung des koagulierten Eiweifses.

Der neutralisierte Ananassaft arbeitet am kräftigsten bei Temperaturen zwischen 50 und 60° C. und zeigt selbst beim Erhitzen auf 70° C. noch eine kräftige Wirkung.

In nachstehender Tabelle ist der Einflufs der Temperatur auf die Thätigkeit des gefällten Enzyms dargestellt; die Versuchsbedingungen waren folgende: 10 g koaguliertes Eieralbumin wurden bei den betreffenden Temperaturen mit 0,05 g des Enzymniederschlags und 100 ccm Wasser 5 Std. lang digeriert.

Temperatur	Verdautes Eiweifs %
40° C.	7,9
45 „ „	9,6
50 „ „	11,4
55 „ „	11,9
60 „ „	12,5
65 „ „	9,4
70 „ „	8,3

Das Optimum liegt hier ungefähr bei demselben Punkt wie beim neutralen Saft.

Papaïn.

Die Frucht des Melonenbaumes steht seit langer Zeit in dem Ruf, das Fleisch zarter zu machen, welches damit gekocht wird. In neuerer Zeit hat man gefunden, dafs der Saft der Frucht ein proteolytisches Enzym von beträchtlicher Stärke enthält. Zuerst wurde es von *Würtz* im Jahre 1879 untersucht; dieser entdeckte, dafs das Enzym nicht nur auf den Saft der Frucht beschränkt, sondern auch im Saft des Stammes und der Blätter enthalten ist. Man kann es in sehr rohem Zustande durch Auspressen des

Digitized by Google

Saftes aus den Geweben der Pflanzen gewinnen, dem man dann Alkohol bis zur Entstehung eines Niederschlages zusetzt, diesen abfiltriert, mit absolutem Alkohol auswäscht und bei niederer Temperatur trocknet. Der aus den Pflanzen gewonnene Saft ist neutral und enthält Eiweifsstoffe gelöst. *Würtz* nahm an, dafs das Enzym selbst ein Eiweifsstoff sei, und gab als Reaktionen desselben an: es wird beim Kochen nicht koaguliert, giebt mit Sublimat keine Fällung, giebt einen Niederschlag mit Salpeter- oder Salzsäure, der im schwachen Überschufs des Lösungsmittels löslich ist; es giebt ebenso einen Niederschlag mit Essigsäure und gelbem Blutlaugensalz. *Würtz* giebt ferner an, dafs es in neutraler Lösung tierisches Eiweifs löst unter Bildung von Peptonen und Leucin. Zur damaligen Zeit kannte man noch nicht den Unterschied zwischen Peptonen und Zwischenprodukten, besonders Albumosen, und viele Körper der letzteren Klasse wurden fälschlicherweise für Peptone gehalten.

Eine vollständigere Untersuchung des Melonensaftes und der darin enthaltenen Enzyme stellte *Martin* in den Jahren 1883 und 1884 an. Er fand, dafs die Eiweifsstoffe im neutralen Saft aus einem Albumin bestanden, einem Globulin, und zwei Arten Albumose, die er α- und β-Phytalbumose nannte. Ein Vergleich dieser Körper mit den neuerdings untersuchten weist darauf hin, dafs das erstere eine Art Proto-Proteose ist und die letzteren zu den Hetero-Proteosen gehört. Wie wir sehen, war über den Charakter und das Verhalten der Proteosen oder Albumosen bis zu den genaueren Untersuchungen von *Chittenden* im Laboratorium der Yale-Universität verhältnismäfsig wenig bekannt. Ein Vergleich der beiden *Martin*schen Körper mit den verschiedenen Klassen der Proteosen von *Chittenden* läfst kaum einen Zweifel darüber, dafs sie als Proto-Proteose und Hetero-Proteose anzusehen sind. *Martin* fand, dafs der Melonensaft zwei Enzyme enthält, ein Milchgerinnungsenzym (Lab) und ein zweites proteolytisches, das wir jetzt als Papaïn kennen. Letzteres ist eng vergesellschaftet mit der α-Phytalbumose, einer Proto-Proteose.

Martin stimmt mit *Würtz* darin überein, dafs das Papaïn am besten in neutraler Lösung wirkt, wie der des frischen Saftes. In annähernd reinem Zustande wird es ziemlich leicht durch Salzsäure von stärkerer Konzentration als 0,05 % zerstört, doch

Digitized by Google

ist es in schwach alkalischer Lösung, z. B. in einer 0,20prozentigen Sodalösung, fast ebenso wirksam als in neutraler. Ein höherer Gehalt an Alkali zerstört es.

Martin hat festgestellt, dafs die günstigste Temperatur für die Papaïn-Hydrolyse 35—40° C. ist, obgleich es bei niederen Temperaturen, z. B. bei 15° C., noch wirksam ist.

Wird Fibrin der Wirkung des Papaïns in neutraler Lösung unterzogen, so wird es geradeso wie von Pankreassaft angegriffen; es wird mehr zerfressen als gelöst und in eine breiige Masse verwandelt, wobei eine starke Trübung eintritt. Als Verdauungsprodukte stellte *Martin* einen globulinartigen Körper, scheinbar ein Zwischenprodukt zwischen dem wahren Globulin und Alkali-Albumin, fest, ferner etwas Pepton und Leucin und Tyrosin, Leucin in gröfserer Menge.

Martin prüfte auch noch mit grofser Genauigkeit die Wirkung des Papaïns auf die Eiweifsstoffe des Melonensaftes. Bei der Digestion mit dem Globulin oder Albumin hinterblieb eine kleine Menge eines unlöslichen Restes, der wahrscheinlich eine Art Antialbumin war, wie es *Chittenden* mit Bromelin erhielt. Am Schlusse des Abbauprozesses wurde in der Lösung hauptsächlich die Hetero-Proteose gefunden, die *Martin* β-Phytalbumose nannte, während auch Spuren Pepton und Leucin und Tyrosin vorhanden waren.

Die Verdauung der α-Phytalbumose oder der Proto-Proteose lieferten etwas Antialbumid, etwas Deutero-Proteose, kein Pepton und eine gewisse Menge Leucin und Tyrosin. Die β-Phytalbumose zeigte dieselbe Zersetzung.

Aus *Martins* Untersuchungen geht hervor, dafs der Abbauprozefs bei dem Papaïn ebenso verläuft wie beim Bromelin. Der aus der Pflanze ausgezogene Saft enthält zwei Albumosen oder Proteosen, doch ist es höchst wahrscheinlich, dafs diese durch die Wirkung des Enzyms gebildet werden, bevor der Saft extrahiert wird, dafs sie also nicht die primären Eiweifsstoffe der Pflanze sind. Beide liefern die Deutero-Albumose, wenn das isolierte Papaïn darauf einwirkt.

Sowohl das ursprüngliche Eiweifs als auch das Globulin vermögen im Verlaufe von Laboratoriums-Versuchen Hetero-Proteose zu bilden, und es ist nicht unwahrscheinlich, dafs die Proto-

Digitized by Google

Proteose zu gleicher Zeit gebildet, jedoch gleich nach ihrer Bildung weiter zersetzt wird. Wenn dies der Fall ist, so verläuft der Abbauprozeſs genau ebenso wie beim Bromelin. Die primären Eiweiſsstoffe, Albumin und Globulin, liefern die beiden Proteosen, Proto- und Hetero-Proteose, die beide den Hemi- und Anti-Resten der primären Spaltung entstammen können. Aus dem Anti-Rest bildet sich auch die kleine Menge Antialbumid, welches in diesem Falle ebenso wie bei der Bromelin-Digestion entsteht. Die Proto- und Hetero-Proteosen liefern bei weiterer Digestion Deutero-Proteose, von der *Chittenden*, wie bereits erwähnt, nachwies, daſs sie eine Stufe näher zum Pepton ist. Die Deutero-Proteose wird dann zu Pepton abgebaut. Da das entstehende Pepton von den Proteosen sowohl der Anti- als auch der Hemigruppe abstammt, so ist es ein Gemisch von Antipepton mit Hemipepton. Letzteres wird in Leucin und Tyrosin gespalten, während ersteres als Pepton am Schluſs der Digestion verbleibt.

Martins Versuchsergebnisse sind seitdem von anderen Forschern bestätigt worden. *Davis* fand ferner, daſs die Wirkung des Enzyms durch die Gegenwart von 0,005 % Salzsäure oder 0,25 % Soda gehoben, doch durch 0,05 % Salzsäure gänzlich zerstört wird.

Sharp stimmt mit *Martin* darin überein, daſs Proto-, Hetero- und Deutero-Proteosen während des Eiweiſsabbaues gebildet werden, er bezweifelt jedoch die Bildung von Pepton. Er giebt an, daſs sich auch etwas Dysproteose bilde.

Halliburton giebt an, daſs Papaïn tierisches Eiweiſs in Proteosen und Pepton verwandelt, daſs es jedoch bei der Einwirkung auf Pflanzeneiweiſs bei der Bildung von Proteosen abschneidet und kein Pepton bilde.

Es ist schwer, diese Ergebnisse, d. h. die Nichtbildung des Peptons mit dem Auftreten von Leucin und Tyrosin in Einklang zu bringen. Von den letzteren ist nicht nachgewiesen, daſs sie aus einer direkten Zersetzung der Proteosen entstehen. Wir müssen annehmen, daſs bei den Versuchen dieses Forschers das Pepton gänzlich zersetzt war. *Martin* beobachtete das gleiche Verschwinden des Peptons beim Abbau der Albumose.

Helbing und *Passmore* fanden Pepton bei der Papaïn-Verdauung sowohl des Myosins, als auch des Eier-Albumins und

Digitized by Google

trennten sie von den anderen Eiweifsstoffen durch Sättigen der Flüssigkeit mit Ammoniumsulfat nach der Methode von *Chittenden.*

Rideal giebt auch an, die Bildung von Pepton in Papaïn-Digestionen nachgewiesen zu haben, indem er die dialytische Kraft der Eiweifsstoffe durch Pergament-Papier prüfte. Beim Arbeiten mit Eieralbumin brachte er die ganzen Abbau-Produkte in einen Dialysator und konstatierte nach 10 Minuten Eiweifs im äufseren Wasser. Wenn auch die Proteosen durch eine Pergament-Membran dialysieren, so geschieht dies doch sehr langsam im Vergleich zum Pepton. *Rideal* kommt zu dem Schlufs, dafs die Schnelligkeit der Dialyse unzweideutig auf die Gegenwart von Pepton und Proteose hinweist. Er bestätigte dieses Ergebnis durch die Methode des Sättigens mit Ammoniumsulfat.

Neuere, im Laboratorium *Chittendens* ausgeführte Untersuchungen bestätigen die Angabe älterer Forscher vollauf, dafs Papaïn wirkliches Pepton bildet. *Neumeister* versichert das Gleiche.

Rideal macht darauf aufmerksam, dafs das Papaïn sehr wirksam ist, wenn es in verhältnismäfsig kleiner Flüssigkeitsmenge arbeitet. Eine Verdünnung der Digestionsflüssigkeit übt einen bemerkenswerten verzögernden Einflufs auf den Verlauf der Hydrolyse aus. Er giebt an, am zweckmäfsigsten sei es, das $1^1/_2$ bis 3fache des Gewichtes des der Wirkung des Enzymes unterworfenen Eiweifses an Flüssigkeit zu nehmen.

Als der Wirkung des Papaïns günstigste Temperatur giebt er 40° C. an.

Andere pflanzliche Trypsine.

In den Samen, deren Reservestoff zu einem grofsen Teil aus Eiweifs bestehen, vermutete man das Vorkommen von proteolytischen Enzymen bald nach dem Nachweis der Diastase in denselben. Gefahndet wurde auf dieselben zuerst im Jahre 1874 von *Gorup-Besanez.* Er entdeckte ein solches Enzym in den Samen der Wicke und dann nacheinander in den Samen des Hanfes, des Flachses und der Gerste. Er giebt an, dafs es imstande sei, Fibrin in Pepton zu verwandeln, augenscheinlich aber untersuchte er nicht seine Wirkung auf die Eiweifsstoffe, mit denen es zusammen in den Samen vorkommt. Aufser, dafs er uns Mit-

Digitized by Google

teilung über die Existenz des Enzyms macht, hat er weiter nicht viel darüber angegeben. *Krauch* widersprach im Jahre 1878 den Ansichten *von Gorup-Besanez'* und leugnete das Vorkommen eines solchen Enzyms. *von Gorup-Besanez* giebt an, daſs der von ihm aus dem Wickensamen isolierte Körper Fibrin löste und daſs die abfiltrierte Lösung eine deutliche Biuretreaktion gab, die er dem Pepton zuschreibt. *Krauch* dagegen behauptet, daſs die Biuret-Reaktion von einer im Auszug enthaltenen Substanz herrühre und leicht von dem Auszug allein gegeben werde. Er führt die Verminderung des Fibrins auf ein Schrumpfen seiner Substanz und nicht auf eine Lösung zurück. *Krauchs* Arbeiten jedoch erscheinen unglaubwürdig, denn *Gorup-Besanez* giebt an daſs das Fibrin fast verschwindet, und dies erklärt *Krauch* nicht. Auch zeigt er nicht, daſs kein weiterer Körper die Biuret-Reaktion gebender Körper gebildet werde, wenn auch der Auszug selbst die gleiche Reaktion gegeben haben mag. *Krauchs* eigene Kontroll-Versuche waren etwas dürftig. *von Gorup-Besanez* ermittelte nicht, ob die Zersetzung des Fibrins bis über die Peptonstufe hinausgeht, er stellte jedoch fest, daſs unter gewissen Bedingungen groſse Mengen Amide, z. B. Leucin und Asparagin, in den Schoten ganz junger Wickenpflanzen nachgewiesen werden können.

Eine Reihe von Versuchen wurde vom Verfasser im Jahre 1886 mit den Samen einer Lupinenart (Lupinus hirsutus) ausgeführt. Die Versuche wurden mit keimenden Samen angestellt; die Keimung hatte vier Tage gewährt, und die Würzelchen waren nahezu drei Zoll lang. Die Kotyledonen wurden abgetrennt, in einer Mühle gemahlen und mit Glycerin extrahiert. Der Auszug wurde abgegossen und dialysiert, bis er frei war von Amiden. Er enthielt alsdann die in neutralen Flüssigkeiten löslichen Eiweiſsstoffe der gekeimten Samen.

Dieser Auszug konnte Fibrin in schwach saurer Lösung auflösen. Das benutzte Fibrin wurde zuerst in Wasser, dann in 0,2 prozentiger Salzsäure gekocht, wodurch es aufquoll und durchsichtig wurde. Kontrollversuche, bei denen das Fibrin in ebenso starker Salzsäure suspendiert wurde, zeigten, daſs ohne Auszug während der Digestion keine Verminderung stattfand. In der sauren Extraktflüssigkeit wurde das Fibrin korrodiert,

Digitized by Google

wobei die Flüssigkeit sehr trübe wurde. Dann wurde es allmählich gelöst bis auf kleine Mengen körniger Reste. Weitere Kontrollversuche wurden mit gekochtem Auszug angestellt.

Die Digestionen wurden gewöhnlich in pergamentenen Dialysierröhren angestellt, und die Aufsenflüssigkeit wurde oft gewechselt. Diese Flüssigkeit hatte denselben Säuregehalt wie die im Dialysator befindliche. Nach kurzer Zeit wiesen die Dialysate einen Gehalt an Pepton auf oder doch einen Körper, der die Biuret-Reaktion gab; durch geeignete Behandlung konnte man daraus Krystalle von Leucin und Tyrosin erhalten, letzteres in nur geringer Menge. Hatte der Abbauprozefs einige Zeit gewährt, so enthielt die Flüssigkeit im Dialysator ein Eiweifs, das beim Neutralisieren gefällt wurde und das in verdünnten Säuren und Alkalien löslich war; auch war eine beträchtliche Menge von Proteosen, hauptsächlich Hetero-Proteosen vorhanden. Der Abbau-Prozefs schien also ebenso zu verlaufen wie beim Papaïn.

Bei den Versuchen mit dem aufgekochten Auszug blieb das Fibrin ungelöst.

Man prüfte ferner die Einwirkung des Enzyms auf die Eiweifsstoffe des ruhenden Samens. Es waren dies drei Eiweifsstoffe, ein Globulin und zwei Albumosen oder Proteosen, augenscheinlich Proto- und Hetero-Proteosen. Es schien, als ob der Glycerinauszug diese Eiweifsstoffe in Pepton verwandelte, ebenso die Bildung von Amiden, hauptsächlich von Asparagin, aber auch einer gewissen Menge Leucin, bewirkte.

Verfolgt man den Verlauf der Digestionswirkung auf tierisches und pflanzliches Eiweifs, so scheint dieser so zu sein, dafs das primäre Eiweifs, z. B. Fibrin, in primäre Proteosen und Acidalbumin nebst einer kleinen Menge Antialbumid zerfällt; die primären Proto- und Hetero-Proteosen, mögen sie nun aus dem Fibrin gebildet oder in den Samen vorgebildet sein, wurden dann in den für Pepton gehaltenen Körper übergeführt, der aber wahrscheinlich ein Gemenge des letzteren mit Deutero-Proteose war. Dies wird durch *Chittendens* Untersuchungen über Bromelin wahrscheinlich gemacht, doch läfst sich nichts Gewisses sagen, da seine Methoden zur Trennung der beiden Eiweifsstoffe damals noch nicht bekannt waren. Ein Teil des Peptones wurde alsdann zersetzt und in die bereits erwähnten Amide übergeführt.

Digitized by Google

Man fand, dafs das Enzym am besten in einer 0,2 prozentigen Salzsäure-Lösung wirkt, was sich ungefähr mit dem natürlichen Säuregehalt der Pflanzensamen deckt. Bei Erhöhung der Säuremenge wurde der Abbau verlangsamt. Das Enzym wurde in schwach alkalischer Lösung gänzlich unwirksam; 0,5 prozentige Soda zerstört es gänzlich. Neutrale Salze, z. B. Kochsalz, hemmten zwar die Wirkung, zerstörten jedoch nicht das Enzym. Die günstigste Temperatur für die Thätigkeit des Enzyms war etwa 40° C., es arbeitete dann etwa 2 mal so schnell als bei gewöhnlicher Temperatur.

Der ruhende Same gab an Glycerin kein wirksames Enzym ab. Der Glycerin-Auszug wurde jedoch wirksam bei kurzem Erwärmen mit verdünnter Säure; hierin zeigt es Ähnlichkeit mit dem Pankreassaft. Die Versuche deuten daher auf ein Zymogen im Samen hin, das durch sogenannte schwache Säuren in Enzym umgewandelt wird. Es ist bemerkenswert, dafs ein solcher Wechsel in der Reaktion des Samenparenchyms zum Beginn der Keimung stattfindet. Es ist jedoch schwer, wenn nicht ganz unmöglich, die Gegenwart des Zymogens nachzuweisen, da der Abbau des Eiweifses in Gegenwart eines solchen Samens stattfinden mufs. Man kann jedoch seine Existenz wahrscheinlich machen durch eine von *Langley* und *Edkins* bei ihrem Studium des Zymogens des Pepsins angewandten Methode. Eine Beschreibung dieser Methode folgt in einem späteren Kapitel.

Der Verfasser entdeckte später das Vorkommen dieses pflanzlichen Trypsins im keimenden Samen der Castoröl-Pflanze (Ricinus communis).

Neumeister hat seitdem gezeigt, dafs ein derartiges Enzym in Sämlingen nicht selten ist. Er hat es aus Gerste, Mohn, Weizen, Mais und Raps extrahiert. Es kommt zwar in den ersten Stadien der Keimung nicht vor, entwickelt sich jedoch mit dem Wachstum des Keimlings und ist in reichlicher Menge vorhanden, wenn dieser eine Länge von 15—20 cm erreicht hat. Er stellte es nach einer neuen Methode dar. Nach Darstellung eines Auszuges aus den Sämlingen weicht er feuchtes Fibrin darin ein. Dieses Eiweifs scheint die Eigentümlichkeit zu besitzen, das Enzym aus der Lösung aufzusaugen. Das so mit dem Enzym getränkte Fibrin wurde herausgenommen, in eine saure oder alka-

Digitized by Google

lische Flüssigkeit gebracht und beobachtet; daneben wurde Fibrin, das nicht im Samenauszug gelegen hatte, mit derselben Flüssigkeit digeriert. *Neumeister* giebt an, dafs das Enzym nur in saurer Lösung wirkt, dafs die Säure eine organisehe sein müsse; am besten sei Oxalsäure; Mineralsäuren, z. B. Salzsäure zerstören es.[1])

---

[1]) Neuerdings haben *Windisch* und *Schellhorn* eine umfangreiche Untersuchung veröffentlicht: Über das eiweifsspaltende Enzym der gekeimten Gerste (Wochenschrift für Brauerei, 1900, S. 334 ff.).

Diese Forscher kamen auf Grund ihrer Untersuchungen zu folgenden zusammenfassenden Schlüssen:

1. In der gekeimten Gerste ist ein proteolytisches Enzym enthalten. Beweis dafür ist:
   a) die Verflüssigung von Gelatine,
   b) die Selbstverdauung wässeriger Malzauszüge,
   c) die Gewinnung eines proteolytisch wirkenden Körpers durch Extraktion von Malz mittelst Glycerin.
2. Das Enzym wirkt auf durch den Keimprozefs gelöstes Eiweifs je nach Temperatur und Säuregehalt der Lösung in verschiedener Weise ein.
   a) bei niedriger Temperatur ist der Abbau weitgehend, aber langsam,
   b) bei höherer Temperatur ist der Abbau schnell, aber nicht weitgehend,
   c) Zusatz von organischen Säuren (Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, 0,2—0,4 %) wirkt fördernd auf die Menge des abgebauten Eiweifses,
   d) Anhäufung der Verdauungsprodukte in den Lösungen hemmen die weitere Thätigkeit des Enzyms.
3. Das Enzym liefert bei der Verdauung von Gersten- resp. Malzeiweifs keine wahren Peptone.
4. Das Enzym wirkt auf ungelöstes Eiweifs und eiweifsartige Stoffe tierischen Ursprungs bei saurer, neutraler sowie alkalischer Reaktion ein. Auf letztere (Gelatine) am besten in alkalischer Lösung. Bei der Einwirkung auf tierische Eiweifsstoffe entstehen Peptone, welche sich durch die Biuretprobe gut nachweisen lassen. Auf ungelöste Eiweifsstoffe konnte nur geringe Einwirkung festgestellt werden.
5. Die Möglichkeit der Verdauung in alkalischen, neutralen und sauren Lösungen, sowie der weitgehende Abbau der Eiweifsstoffe in Malzauszügen sprechen für die tryptische Natur des Enzyms.
6. In der rohen Gerste ist in geringer Menge dasselbe oder ein ähnliches Enzym vorgebildet. Dieses läfst sich zwar nicht durch Verflüssigung von Gelatine nachweisen, giebt sich aber zu erkennen durch teilweisen Abbau der in einem wässerigen Gerstenauszug enthaltenen Eiweifsstoffe. Durch Zusatz kleiner Mengen organischer Säuren wird dieser Abbau unterstützt.
7. In schlecht geernteten (ausgewachsenen) oder eiweifsreichen Gersten kann das Enzym schon in beträchtlicher Menge vorkommen.


Digitized by Google

Der Verlauf der Proteolyse in den Cerealien ist bislang nicht genau studiert worden; er scheint jedoch gegen die bislang beschriebenen Unterschiede aufzuweisen. *Osborne* und *Campbell* haben die Eiweifsstoffe der Gerste und des Malzes mit besonderem Hinblick auf die Veränderungen, die sich während des Mälzprozesses vollziehen, geprüft. — Gerste enthält annähernd 11% Eiweifs; davon etwa 2% eines Globulins, Edestin, mit einer kleinen, nicht abtrennbaren Menge Proteose, 0,3% eines Albumins, Leukosin, und 4% eines besonderen Proteïds, Hordeïn. Letzteres unterscheidet sich von allen Eiweifsstoffen tierischen Ursprungs dadurch, dafs es in 70prozentigem Alkohol löslich ist, während es in Wasser unlöslich ist. Der Rest der Gersteneiweifsstoffe ist in Wasser, Pottasche und Alkohol unlöslich. Das Malz enthielt kein Hordeïn mehr; es war zum Teil durch ein anderes, ebenfalls in Alkohol lösliches Eiweifs ersetzt, dem die Forscher den Namen Bynin beilegten. Ein anderes Globulin,

---

8. Während des Weichprozesses findet keine wesentliche Vermehrung des Enzyms statt. Diese tritt aber sofort ein bei Beginn der Keimung, um dann im weiteren Verlauf derselben bis zum bereits grünenden Gerstenpflänzchen in stetem Anwachsen zu bleiben.
9. Der Eintritt der Enzymbildung läfst sich bei eiweifsreichen Gersten eher nachweisen als bei eiweifsarmen. Man kann daher event. aus dem Verhalten der keimenden Gerste gegen Gelatine Schlüsse auf die Qualität der Gersten ziehen.
10. Durch den Darrprozefs wird das Enzym geschwächt, aber nicht zerstört.
11. Bei der Gewinnung des Enzyms durch Glycerin-Extraktion ist es vorteilhaft, die Alkohol-Ätherfällung möglichst bald abzufiltrieren. Längere Einwirkung von Alkohol wirkt nachteilig; ebenso das Trocknen des Enzyms.
12. Temperaturen bis zu 60° C. töten das Enzym in Malzauszügen nicht; die Zerstörung desselben tritt bei 70° C. ein.
13. Unter den bisher angewendeten Versuchsbedingungen vermag das Malzenzym nicht, in ungelöstem Zustande vorhandenes Gersten- resp. Malzeiweifs anzugreifen. Diese Eigenschaft hat es mit Papaïn und Bromelin gemeinsam.
14. Bei der Verdauung vom Gersteneiweifs mit Papaïn oder Bromelin wird kein Pepton gebildet. Es ist daher allgemein anzunehmen, dafs Gersteneiweifs bei dem Abbau durch pflanzliche Enzyme kein Pepton liefert.
15. Proteolytische Enzyme lassen sich in einer Reihe von gekeimten Samen nachweisen, es ist wahrscheinlich, dafs sich solche stets bei der Keimung bilden.

Digitized by Google

das Bynedestin, war an Stelle des Edestins getreten. Zwei Proteosen, in der Menge von etwa 1,3 % des Gesamteiweifses enthält das Malz ebenfalls. Auch enthält es noch einen beträchtlichen Teil des unlöslichen Proteïds, wenn auch etwa 1 % weniger als die Gerste. Die Gesamtmenge der Stickstoffsubstanz im Malz war etwas weniger als 8 %, so dafs während der Keimung etwa 3 %, oder nahezu ein Drittel des Gesamtstickstoffs, verschwunden waren. Die Forscher kommen zu dem Schlufs, dafs die Proteïde während des Keimprozesses eine tiefgehende Veränderung erleiden, ehe sie in die Form der Proteosen übergehen. Die an die Stelle des Hordeïns und Edestins getretenen Eiweifsstoffe sind reicher an Kohlenstoff und ärmer an Stickstoff. Die Forscher konnten kein Enzym entdecken, dem sie diese Veränderungen zuschreiben könnten.

Oben erwähnten wir bereits, dafs das proteolytische Vermögen des Ananas-Saftes zuerst von *Marcano* beobachtet wurde. Einige Jahre früher fand er, dafs der ausgeprefste Saft der Blätter einiger Arten von Algave imstande war, Fleisch zu verdauen, wenn letzteres darin einige Zeit bei 35—40° C. eingelegt wurde. Die Verdauung ging etwas langsam vor sich; nach etwa 26stündiger Einwirkung waren jedoch 20 % des Fleisches in „Pepton" ververwandelt, das wahrscheinlich aus einem Gemenge von Pepton und Proteosen bestand. Das Ergebnis war also, dafs die Agave ein proteolytisches Enzym enthält. Der Abbauprozefs ging auch sehr gut bei Gegenwart von Chloroform vor sich, so dafs er nicht etwa auf Fäulnisprozesse zurückzuführen war. *Marcano* giebt an, dafs er dieses proteolytische Vermögen in einer grofsen Anzahl Früchte festgestellt hat.

Im Jahre 1880 führte *Bouchut* einige Untersuchungen über den Saft des Feigenbaumes (Ficus Carica) aus; er fand darin ein kräftiges Enzym, das Eiweifsstoff zu lösen imstande war. *Hansen* untersuchte dieselbe Pflanze in den Jahren 1883 und 1884 und bestätigte *Bouchuts* Angaben. Er giebt an, das Enzym wirke am besten in saurem Medium, doch sei es auch in einer alkalischen Flüssigkeit nicht ganz ohne Wirkung. *Mussi* machte das Enzym im Jahre 1890 zum Gegenstand einer eingehenderen Untersuchung. Er prefste aus den Zweigen, Blättern und Früchten des Feigenbaumes den Saft aus, filtrierte ihn blank und fällte

Digitized by Google

gewisse Bestandteile desselben mit absolutem Alkohol. Der entstehende Niederschlag war unlöslich in Wasser, löste sich jedoch leicht bei Zufuhr von Spuren Säure oder Alkali. Wenn seine Lösung mit feuchtem Fibrin zusammengebracht wurde, so löste sie dieses leicht. *Mussi* legte dem Enzym den Namen Cradina bei. In neutralen Flüssigkeiten ist es unwirksam. *Mussi* gab mehrere Reaktionen desselben an; nach der Art der Darstellung mufs es jedoch sehr unrein gewesen sein, und deswegen sind die von ihm angegebenen Reaktionen belanglos.

Der Verfasser untersuchte im Jahre 1892 eine andere indische Frucht, den Kachree-Kürbis (Cucumis utilissimus), mit ähnlichem Ergebnis. Die Frucht ist etwa 6 Zoll lang. Sie ist gelb, und beim Durchschneiden entwickelt sie ein Aroma, ähnlich dem der Melone. Ihr Fleisch ist sehr saftig, der ausgeprefste Saft ist schwach sauer. Sowohl der Saft, als auch das Fleisch des Pericarps enthalten ein Enzym, das mit einem globulinähnlichem Eiweifs vergesellschaftet ist. Das Enzym läfst sich aus dem Fleisch sehr leicht durch eine verdünnte Salzlösung, z. B. eine 3 prozentige Kochsalzlösung, ausziehen. Dieser Auszug wirkt langsam auf koaguliertes Eier-Albumin und liefert dabei Proteosen, Pepton und Leucin. Am wirksamsten ist es in schwach alkalischem Medium, weniger in neutralem und noch schwächer in saurem.

Im Jahre 1892 beschrieben *Daccomo* und *Tommasi* ein Enzym, das sie aus Anagallis arvensis erhalten hatten. Es kann als weifse, amorphe Substanz in Wasser leicht löslich erhalten werden. Die Verfasser geben an, dafs Fleisch oder feuchtes Fibrin, welches mit der trocken zerriebenen Pflanze 4—5 Stunden bei 60° C. in Berührung gelassen werden, in hohem Mafse erweicht werden, wenn auch eine vollständige Lösung erst nach 36 Stunden beobachtet werden kann. Man hat festgestellt, dafs das Enzym Fleischauswüchse und hornige Warzen zu lösen vermag.

Die normale Wirkungsweise der proteolytischen Enzyme, die bislang beschrieben wurden, ist wahrscheinliche eine intracellulare. Das ist sicherlich der Fall mit dem Trypsin der keimenden Samen, das in der That in den Zellen gebildet wird, in denen das Reserve-Eiweifs liegt. Wir finden jedoch im Pflanzenreich Fälle, wo eine proteolytische Sekretion auf der Oberfläche der

Digitized by Google

Pflanze oder in besonderen Behältern stattfindet, wo sich ein Verdauungsprozeſs abspielt, der dem der Tiere auſserordentlich ähnlich ist. Die in Rede stehenden Pflanzen sind die sogenannten insektenfressenden Pflanzen, die nach verschiedenen Methoden die darauf niederfallenden Insekten fangen, töten und verdauen. Die bekanntesten darunter sind die Kannenpflanzen Nepenthes, Sarracenia, Darlingtonia und andere; gewisse Blätter derselben werden entweder zum Teil oder ganz in feste Behälter umgebildet, die zu Lebzeiten der Pflanze eine beträchtliche Flüssigkeitsmenge enthalten. Die sich auf die Pflanze niederlassenden Insekten werden zum Betreten der Kannen verführt und dann in die darin befindliche Flüssigkeit getaucht. Einige dieser Pflanzen, besonders Sarracenia und Darlingtonia, haben nichts als Wasser in den Kannen; die darin gefangenen Insekten faulen, und die Fäulnis-Produkte werden von der Pflanze aufgesaugt. Nepenthes macht hiervon eine Ausnahme, indem sie in den unteren Teilen der Kanne eine Reihe von Drüsen-Gebilden besitzt. Diese Drüsen scheiden in die Kanne ein proteolytisches Enzym aus, durch dessen Einwirkung die gefangenen Insekten einem wirklichen Verdauungsprozeſs unterliegen, ohne daſs dabei Fäulnisvorgänge sich abspielen. Die Flüssigkeit in den Kannen besitzt in der That antiseptische Eigenschaften. Das Enzym wird gewöhnlich mit dem Pepsin verglichen, hauptsächlich weil während des Verdauungsprozesses die Flüssigkeit sauer ist. Neuerdings zeigte *Vines*, daſs es wahrscheinlich dem Trypsin näher steht.

Das proteolytische Vermögen der Kannenflüssigkeit der Nepenthes konstatierte zuerst *Hooker* im Jahre 1874, der aber weiter nichts nachwies, als daſs sie imstande war, gekochtes Hühnereiweiſs zu lösen.

Lawson Tait stellte im folgenden Jahre das Enzym in unreiner Form dar und sprach es als ein pepsinähnliches Enzym an. Etwas später studierte *Gorup-Besanez* eingehend seine Wirkung auf Fibrin. Er fand, daſs es Fibrin unter Bildung eines löslichen Körpers löst, der die damals bekannten Reaktionen des Peptons gab. Er fand, daſs zur Bildung des Enzyms ein Anreiz der Kannen durch eine verdauliche Substanz nötig sei, sowie es mit den Magendrüsen der Säugetiere der Fall ist. Auf einen solchen Anreiz folgte die Ausscheidung einer sauren

Digitized by Google

Flüssigkeit mit ausgesprochener proteolytischer Kraft. Letztere zeigte sich blofs, solange die Flüssigkeit sauer war und war bei 40° beträchtlich gröfser als bei 20°. Diese Ergebnisse von *Gorup-Besanez* wurden durch andere Forscher bestätigt. *Vines* zeigt im Jahre 1877, dafs die Kannen einen proteolytischen Auszug geben, wenn man sie zerkleinert und mit Glycerin auszieht. Ein solcher Auszug ist nicht ganz so wirksam, wie die wirkliche Ausscheidung der Drüsen in die Kannen. Wenn eine nicht gereizte Kanne mit Glycerin extrahiert wird, so ist das erhaltene Extraktionsprodukt unwirksam, erwärmt man es jedoch einige Zeit mit verdünnter Säure, so wird es wirksam. Die Kannenwände enthalten also ein Zymogen, gerade so wie die Magen- und Pankreas-Drüsen.

Neuerdings hat sich inbetreff des proteolytischen Vermögens ein Streit entsponnen; *Dubois* und *Tischutkin* geben gleichzeitig an, dafs es ihnen nicht möglich war, mit der Kannenflüssigkeit tierische Substanz zu verdauen, wenn die Versuche unter antiseptischen Vorsichtsmafsregeln durchgeführt wurden. Sie schreiben die Peptonisationen, die *von Gorup-Besanez*, *Vines* und andere beobachtet haben, der Wirkung von Bakterien zu. Auf der anderen Seite behauptet wiederum *Goebel*, dafs er gefunden habe, dafs die Kannenflüssigkeit, wenn sie mit Salzsäure sauer gemacht wurde, Fibrin leicht verdaute, und dafs dieselbe Flüssigkeit beim Kultivieren auf Gelatine keine Organismen irgend welcher Art aufkommen liefs.

Es ist schwer, die Nichtübereinstimmung dieser Versuchsergebnisse miteinander in Einklang zu bringen; möglicherweise beeinflufst das Alter der Kanne, die Beschaffenheit der Pflanze oder andere Umstände die Bildung des Enzyms. Immerhin mufs man auf die positiven Ergebnisse gröfseres Gewicht legen als auf die negativen.

Neuerdings hat *Vines* den Gegenstand wieder aufgenommen, und zwar mit dem Ergebnis, dafs das Enzym existiert und von tryptischem Charakter ist, indem es das verdaute Eiweifs bis zu krystallinischen Amidkörpern abbaut. Seine Versuche führte er unter streng antiseptischen Vorsichtsmafsregeln aus. Ein typischer Versuch, den er mit der Sekretion von Nepenthes Mastersiania durchführte, möge hier mitgeteilt werden:

Digitized by Google

»In zwei Probieröhrchen verbrachte man je 5 ccm neutrale Kannenflüssigkeit und zerkleinertes Fibrin; zum einen (A) fügte man 5 ccm 0,25 prozentige Salzsäure, zum andern (B) 5 ccm destilliertes Wasser; die Röhrchen wurden um 11 Uhr 30 Min. vormittags in den Brutofen bei etwa 35° C. verbracht. Um 2 Uhr 30 Min. war das Fibrin im Röhrchen A vollständig gelöst und die Flüssigkeit gab eine deutliche Biuretreaktion. Das Fibrin im Röhrchen B war um 9 Uhr am folgenden Morgen noch ungelöst; dann fügte man 5 ccm 0,25 prozentige Salzsäure hinzu mit dem Ergebnis, dafs das Fibrin in 2 Stunden vollständig verschwunden war.«

Angesichts dieses Versuches kann man kaum die Gegenwart eines Enzyms leugnen. Fibrin wird durch 0,125 prozentige Salzsäure nur äufserst langsam gelöst; die Wirkung der Bakterien ist auch nicht so rasch, als dafs man sie für die Lösung des Fibrins in der angegebenen Zeit verantwortlich machen könnte.

Vines führt noch mehrere andere Versuche an, die er bei Gegenwart anderer antiseptischer Stoffe z. B. Cyankalium, Thymol, Chloroform und Ätzsublimat, durchführte. In allen Fällen war die Lösung des Fibrins in einigen Stunden eine vollständige. Eieralbumin wurde ebenfalls gelöst, aber nicht ganz so rasch. Die beiden Eiweifsstoffe verhalten sich ähnlich unter der Einwirkung der tierischen Enzyme, doch geht auch hier die Lösung des Fibrins leichter vor sich als die des Eiweifses.

Der Verfasser hat auch die Frage der Bakterienwirkung bei dem Vorgang untersucht. Schwachsaure Kannenflüssigkeit wurde zusammen mit etwas koaguliertem Eieralbumin in eine Flasche gebracht, die verkorkt und bei Seite gestellt wurde. Das Eiweifs wurde allmählich verdaut, unter Hinterlassung eines geringen körnigen Rückstandes. Die Flasche wurde 12 Monate lang beobachtet; nach Ablauf dieser Zeit war die darin enthaltene Flüssigkeit vollkommen durchsichtig und klar und zeigte nicht die Spur einer Bakterien-Infektion. Wäre die Verdauung auf die Wirkung von Mikroorganismen zurückzuführen gewesen, so wäre die Flüssigkeit nach wenigen Tagen trübe geworden, da der Eiweifsgehalt ein ziemlich hoher war.

Bei vielen der bislang besprochenen Enzyme war zu beobachten, dafs sie mit irgend einem Eiweifs vergesellschaftet sind.

Digitized by Google

Die Vereinigung ist eine so nahe, dafs manche Forscher das Enzym und das Eiweifs für identisch gehalten haben. Insofern ist es interessant, dafs *Vines* den Kannen von Nepenthes oft sehr wirksame Flüssigkeiten entnommen hat, die kaum eine Spur Eiweifssubstanz enthielten; sie geben nur eine schwache Xanthoproteïn-Reaktion, keine Fällung mit Salpetersäure oder mit Essigsäure und Blutlaugensalz und koagulieren nicht beim Kochen.

Der Verlauf des Eiweifsabbaues durch das Nepenthes-Enzym scheint ein ähnlicher zu sein wie beim Bromelin und den anderen beschriebenen Trypsinen. Es verbleibt stets ein kleiner unlöslicher Rest von der Natur eines Antialbumids; dann entsteht bei der Neutralisation ein Niederschlag, der jedenfalls Hetero-Albumose ist, ferner Deutero-Albumose, die durch Salpetersäure nicht gefällt wird, eine wechselnde, doch geringe Menge Pepton und etwas Leucin. Einige Forscher stellen die Bildung des Peptons in Frage, doch ist dessen Bildung wahrscheinlich.

Aufser den Kannenpflanzen fangen und verdauen auch noch andere Pflanzen kleine Insekten. Die hauptsächlichsten sind Drosèra, Dionaea und Pinguicula. Wir kennen die Enzyme dieser Pflanzen viel weniger als die der Nepenthes; wir wissen nur, was mit den kleinen Stückchen eiweifsartiger Substanz geschieht, die auf die Blätter gelegt und dort von dem von letzteren ausgeschiedenen Sekret zersetzt werden.

Darwin untersuchte das Verhalten der Blätter von Drosera sehr genau. Diese Blätter sind mit langgestielten Drüsen versehen, die auf Anreiz auf die Oberfläche des Blattes ein besonderes, zähes Sekret von saurer Reaktion ausscheiden. Legt man ein Insekt oder ein Stückchen Eiweifssubstanz auf das Blatt, so biegen sich die Drüsen oder Tentakeln langsam darüber und schliefsen es ein, wobei sie gleichzeitig eine zähe Flüssigkeit ausscheiden. Die Oberfläche und die Umrisse des Blattes sind in gleicher Weise mit diesen Tentakeln versehen, die Ausscheidung der centralen Tentakeln ist jedoch saurer als die der an der Peripherie belegenen. Die gefangene Substanz, lebend oder tot, wird von dem Sekret langsam gelöst, und die Lösungsprodukte werden von der Blattoberfläche absorbiert. *Darwin* fand, dafs die Sekretion nicht nur Eiweifs zu lösen vermochte, sondern auch Bindegewebe,

Digitized by Google

Knorpel und Gelatine; auf Mucin jedoch war es ohne Wirkung. Die Ausscheidung des Enzyms ist wie die der tierischen Drüsen abhängig von der Aufnahme stickstoffhaltiger Substanz durch das Blatt, auch die Säure wird nur unter dieser Bedingung entwickelt. Wird das Blatt durch Darauflegen einer unverdaulichen Substanz gereizt, so findet nur geringe Ausscheidung statt und die ausgeschiedene Flüssigkeit hat kein proteolytischcs Vermögen.

Darwin entdeckte dasselbe Enzym auch in den Blättern von Dionaea. Diese unterscheiden sich von den Blättern der Drosera in der Anordnung der Drüsen; die Oberfläche der Blätter ist mit kleinen, ein wenig gestielten Drüsen von Purpurfarbe bedeckt. Ebenso wie die Drüsen der Drosera scheiden auch die der Dionaea nur dann ein Enzym ab, wenn sie durch Aufnahme von Stickstoffsubstanz gereizt werden. Dann erst scheiden sie eine farblose, schwach schleimige Flüssigkeit aus. Sie ist saurer als die der Drosera und löst wie diese koaguliertes Eiweifs. Pinguicula scheidet in gleicher Weise eine ähnliche Verdauungsflüssigkeit aus, und zwar an den Rändern der oberen Blattfläche, die sich über das gefangene Insekt legen.

Bislang sind über die Abbauprodukte dieser Enzyme noch keine Untersuchungen angestellt worden. Es ist also noch ungewifs, ob sie peptischer oder tryptischer Natur sind. Aus der Analogie mit den Kannenpflanzen kann man schliefsen, dafs sie zur letztgenannten Kategorie gehören; die Frage ist jedoch vorderhand noch eine offene.

Ähnliche Betrachtungen lassen sich mit den Enzymen anstellen, die von mehreren Pilzen secerniert werden. Eines der am frühesten bekannten ist das Enzym, dafs *Kruckenberg* aus dem Plasmodium von Aethalium, einem Myxomyceten, erhielt. Ein Glycerinauszug des Plasmodiums besafs bei Gegenwart von Milchsäure oder Salzsäure ausgesprochene proteolytische Eigenschaften. *Kruckenbergs* Beobachtung wurde von Fräulein *Greenwood* bestätigt, die fand, dafs das Plasmodium eines anderen Gliedes derselben Gruppe mit 0,4 prozentiger Salzsäure einen Auszug lieferte, der deutlich Fibrin löste.

Bourquelot giebt an, dafs ein Auszug aus dem Mycelium von Aspergillus niger sowohl Fibrin, als koaguliertes Eieralbumin bei zweistündiger Digestion bei 40° C. zu lösen vermag. Dabei

Digitized by Google

wird zweifellos Pepton gebildet, am besten in neutraler Flüssigkeit. Der Aspergillus-Auszug vermag auch Gelatine zu verflüssigen.

Bourquelot hat auch aus Polyporus sulfureus einen schwach proteolytischen Auszug erhalten, und *Zopf* giebt an, dafs derartige Enzyme in mehreren anderen Pilzen vorkommen. *Bourquelots* Ergebnisse sind von *Hjort* bestätigt worden.

Steigen wir in der Stufenfolge noch weiter herab, so finden wir proteolytische Enzyme in der Hefe. Hält man diesen Organismus in einer Flüssigkeit, die keine Hefenährstoffe enthält, so z. B. in einer zuckerfreien Flüssigkeit, und entzieht man gleichzeitig den Sauerstoff, so findet eine Verdauung ihres eigenen Reserve-Eiweifsmaterials statt. Wird Hefe trocken abgeprefst, so enthält die abgeprefste Flüssigkeit einen grofsen Teil Eiweifsstoffe, die beim Erhitzen der Flüssigkeit auf 45° C. ein voluminöses Koagulum bilden. Läfst man einige Tage unter antiseptische Vorsichtsmafsregeln stehen, so ist diese Eiweifsart verschwunden, so dafs die Flüssigkeit beim Kochen nur ein geringes Koagulum liefert. Dies alles weist auf das Vorhandensein eines proteolytischen Enzyms in der Hefe hin. *Hahn* hat es ganz neuerdings nach folgender Methode dargestellt. Er prefste Hefe trocken und mahlte sie dann mit Kieselguhr und Sand bis zur Zertrümmerung der Zellen; dann rührte er das gemahlene Pulver mit Wasser zu einem Brei an. Beim Auspressen dieses Saftes erhielt er eine gelbliche Flüssigkeit, die viel Eiweifs enthielt. *Hahn* behandelte einen Teil dieser Flüssigkeit mit Chloroform und fügte feste Gelatine, die eine Spur Phenol enthielt, hinzu. In 24 Stunden wurde eine beträchtliche Menge Gelatine gelöst und der Lösungsprozefs dauerte an, bis das Ganze verflüssigt war. Die Abwesenheit von Hefezellen oder Mikroorganismen wurde durch die benutzten antiseptischen Stoffe sicher gestellt.

Derselbe Forscher wies auch das Enzym in Gemeinschaft mit *Geret* noch in anderer Weise nach. Oben wurde gesagt, dafs der Hefenauszug eine gewisse Menge Eiweifs enthält. Zu diesem Auszug fügten die Verfasser Chloroform und hielten ihn mehrere Wochen bei 37° C. Das Chloroform diente einem doppelten Zweck; es erhielt die Flüssigkeit frei von Mikroben und fällte langsam die Eiweifsstoffe. Die Menge der ausfallenden Substanz wurde langsam, aber allmählich weniger, und nach Ver-

Digitized by Google

lauf einiger Tage war die Flüssigkeit fast klar. Hierauf wurde die Flüssigkeit wieder trübe und die Trübung hielt mehrere Tage an. Der zweite Niederschlag bestand hauptsächlich aus Tyrosinkrystallen, aufserdem wurde in der Mutterflüssigkeit auch etwas Leucin gefunden.

Der Verlauf der Wirkung war also der Verdauung mit pankreatischem Trypsin ähnlich.

Man kennt auch verschiedene Arten von Bakterien, die proteolytische Enzyme enthalten. Im Jahre 1887 wies *Bitter* beim Sterilisieren von Kulturen bei 60° C. nach, dafs einer dieser Organismen in die Flüssigkeit, in der er kultiviert wurde, das Enzym absonderte. Er fand, dafs beim Sterilisieren der Mikroorganismus getötet, das Enzym jedoch nicht zerstört wurde, das auch nachher noch Gelatine verflüssigte und Eiweifs petonisierte. *Hankin* hat aus dem Milzbrand-Bacillus (Bacillus anthracis) ein Enzym isoliert, das aus Fibrin Albumosen bildete. Mehrere giftige Glieder dieser Klasse wiesen ein ähnliches Enzym auf; ein aus den Organismen hergestellter Auszug bewirkte Proteolyse in Abwesenheit der Zellen. Die gewöhnlichen Fäulnisbakterien scheiden ein in der Wirkung auf Eiweifsstoffe dem Trypsin ähnliches Enzym aus. *Sirotinin* wies nach, dafs Flüssigkeiten, in denen gewisse Bakterien kultiviert wurden, nach der Filtration durch Thonzellen imstande waren, Gelatine zu verflüssigen. Die Lebensbedingungen dieser Bakterien beeinflussen häufig die Ausscheidung des Enzyms. *Lauder Brunton* und *Mac Fayden* fanden z. B. bei einem Mikroben, dafs er bei der Kultur in Fleischbrühe Enzym ausschied, sonst aber nicht. In der That stand die Sekretion in einer ganz bestimmten Beziehung zum Kulturmedium; sie wies z. B. diastatische Kraft auf, wenn letzteres aus Stärkekleister bestand. Die beiden Enzyme waren bestimmt nachzuweisen, das proteolytische konnte leichter extrahiert werden. Säuren förderten, und Alkalien hinderten seine Thätigkeit.

Unter den Mikroben, die proteolytische Enzyme ausscheiden, mögen noch einige weitere gut bekannte genannt sein, nämlich *Kochs* Cholerabacillus, *Denekes* Käsebacillus, *Finklers* Cholera-nostras-Bacillus und *Millers* Bacillus. Die Enzyme wurden von *Wood* aus Kulturflüssigkeiten, in denen die Mikroben gewachsen waren und die hierauf durch Antiseptika sterilisiert

Digitized by Google

worden waren, extrahiert. *Wood* fand, dafs die Enzyme aus den verschiedenen Bacillen sich in Bezug auf ihr Verhalten gegen sauere Medien wesentlieh unterschieden: die aus *Kochs* Bacillus gewonnenen wurden durch wenig Säure zerstört, die aus *Finklers* und *Millers* Bacillus gewonnenen wirkten noch in deutlich sauren Flüssigkeiten. *Wood* fand, dafs auch die Bacillen selbst, ganz entsprechend ihren Enzymen, eine verschiedene Empfindlichkeit gegen Säuren besafsen. *Vignal* ermittelte, dafs aufser den bereits erwähnten Bacilleu auch Bacillus mesentericus vulgatus ein peptonisierendes Enzym ausscheidet.

Das proteolytische Enzym in all diesen Bakterien ist mit mindestens einem anderen vergesellschaftet, gewöhnlich mit dem Labenzym.

Fermi hat gefunden, dafs die von mehreren Schizomyceten ausgeschiedenen proteolytischen Enzyme imstande sind, Gelatine zu verflüssigen, was ihrem Vermögen, aus Fibrin Pepton zu bilden, entspricht. Er fand derartige Enzyme in Kulturen von Bacillus subtilis, B. anthracis, B. megatherium, B. pyocyaneus, Vibrio cholerae asiaticae, V. Finkler-Prior, Micrococcus prodigiosus, M. ascoformis, M. ramosus und einigen anderen. Diese Enzyme lösen sowohl Fibrin, als auch Gelatine, wenn auch letztere nicht so leicht. Eieralbumin und koaguliertes Serum-Albumin sind noch widerstandsfähiger, so dafs die Enzyme kaum dem Pepsin oder Trypsin entsprechen. *Fermi* spricht auch die Ansicht aus, dafs in diesen Organismen mehrere Enzyme vorkommen, was ihm der Umstand wahrscheinlich macht, dafs sie bei verschiedenen Temperaturen zerstört werden. So kann z. B. das Enzym des Micrococcus prodigiosus bei 55° C. nicht mehr arbeiten, während die Enzyme des Bacillus pyocyaneus, B. anthracis und Vibrio Finkler-Prior erst bei 60°, 65° bezw. 70° C. zerstört werden. Diese Enzyme gleichen dem Trypsin darin, dafs sie am besten in schwach alkalischer Lösung wirken, wenn sie auch eine Gelatinelösung noch bei Gegenwart von 0,5% Salzsäure angreifen.

Ein weiteres proteolytisches Enzym beschrieb *Duclaux*, das mit dem Abbau des Kaseïns oder Tyreïns der Milch in Verbindung steht, ebenso beim Reifen des Käses eine Rolle spielt. Er nannte es Kasease. Es wird von mehreren zum Genus Tyrothix

Digitized by Google

gehörigen Bakterien abgeschieden, die auch Labenzym enthalten, das in einem späteren Kapitel beschrieben wird.

Dieses proteolytische Enzym kann durch Alkohol im Überschufs aus der Kultur eines dieser Arten gefällt werden. Es wirkt nicht nur auf das durch Lab koagulierte Eiweifs, sondern auch auf das unveränderte Milchkaseïn; seine Wirkung kann an dem Verschwinden der Opalescenz der Flüssigkeit beobachtet werden, da ein fettspaltendes Enzym mit ihm vergesellschaftet ist. Dasselbe Enzym kommt auch in dem leberpankreatischen Sekret der *Sepia* vor, das auf Milch dieselbe Wirkung ausübt. Die Kasease ist ein tryptisches Enzym; unter den Produkten ihrer Thätigkeit finden sich Leucin und Tyrosin. Wenn sie ihre Wirksamkeit im Käse entfaltet, so bilden sich ebenfalls die Amidokörper, die zusammen mit anderen Körpern bei dem Stoffwechsel der Mikroorganismen gebildet werden. *Weigmann* stellte fest, dafs die Kasease aus Bakterienkulturen dargestellt werden kann und dafs sie, dem Käse zugesetzt, dessen Reifung beschleunigt, wie dies die Organismen selbst thun.

Überblickt man alle diese pflanzlichen proteolytischen Enzyme, so sieht man, dafs unsere Kenntnisse bislang noch nicht zur Entscheidung der Frage ausreichen, ob wir es mit einem oder mehreren zu thun haben. Einige von ihnen mögen nun peptischer Natur sein, obwohl es wahrscheinlich ist, dafs sie alle tryptischer Natur sind. Diejenigen unter ihnen, die erschöpfend studiert sind, führen die Proteolyse bis zu den krystallinischen Amiden durch. Wir wissen auch noch nicht, ob es nur ein Enzym giebt, das sich nur etwas in der Art seiner Sekretion unterscheidet, oder ob die verschiedenen besprochenen Pflanzen verschiedene Arten Trypsin liefern. Bromelin und Papaïn zeigen in ihrem Verhalten sehr wenig Unterschied, und man möchte sie eigentlich für identisch halten. Für den Augenblick läfst man jedoch die Frage besser noch unentschieden.

Die Identität der Trypsine tierischen und pflanzlichen Ursprungs ist ebenfalls noch nicht festgestellt. Aus einer Betrachtung der Zusammensetzung der während ihrer Thätigkeit gebildeten Proteosen und Peptone schlofs *Chittenden*, dafs es verschiedene Körper sind. Vom Bromelin sagt er: Es fällt uns der ausnahmsweise niedrige Prozentgehalt an Stickstoff in der Deutero-Albumose

Digitized by Google

und im Pepton auf. In der That läuft das unserer gewöhnlichen Erfahrung über die durch tierische Enzyme gebildeten Abbauprodukte so zuwider, daſs wir es als eine Eigentümlichkeit des pflanzlichen Enzyms ansehen müssen. Bekanntlich weisen die sekundären Proteosen und Peptone, die durch die Wirkung des Pepsins und Trypsins gebildet werden, gewöhnlich einen viel niedrigeren Kohlenstoffgehalt auf als die abgebauten Proteïde, wie z. B. bei den Bromelinprodukten; der Prozentgehalt an Stickstoff hingegen wächst gewöhnlich in demselben Maſse, als der Kohlenstoffgehalt abnimmt... Das pflanzliche Enzym Bromelin zeichnet sich dadurch aus, daſs es sekundäre Proteosen und Peptone mit viel niedrigerem Prozentgehalt an Stickstoff bildet, als sie in der Muttersubstanz enthalten sind; es bewirkt somit die proteolytische Spaltung eines Stickstoff enthaltenden Radikals. Wenn sich dies wirklich so verhält, so hätte man allen Grund, zwischen den tierischen und pflanzlichen proteolytischen Enzymen zu unterscheiden.

Digitized by Google

Kapitel XIV.

Fettspaltende Enzyme (Pialyn, Steapsin).

Die Fette erleiden im Darmkanal der Säugetiere eine doppelte Zersetzung. Eine beträchtliche Menge des Fettes einer Mahlzeit — manche Physiologen behaupten der gröfste Teil — ist im Darminhalt in der Form sehr feiner Körnchen suspendiert, die keine Neigung besitzen, in einander überzufliefsen. Einen solchen Zustand nennt man eine Emulsion. Es ist offenbar ein rein physikalischer Zustand; das suspendierte Fett kann aus der Flüssigkeit durch Schütteln mit Äther gewonnen werden. In diesem Zustand befindet sich das Fett stets in der Milch. Aufser dieser physikalischen Veränderung läuft aber noch eine chemische nebenher; das Fettmolekül wird hydrolysiert, wobei es zu Fettsäure und Glycerin gespalten wird. Wie viel von dem Fett hydrolysiert wird, ist noch nicht bestimmt; viele Forscher behaupten, dafs nur ein kleiner Teil desselben so verändert werde und dafs der gröfsere Teil emulgiert und sonst unverändert von dem Epithel des Eingeweides absorbiert werde. Die beiden Prozesse spielen sich nebeneinander im Zwölffingerdarm ab; es unterliegt keinem Zweifel, dafs die Emulsionbildung durch die gleichzeitige Hydrolyse wesentlich unterstützt wird. Eine kleine Menge Seife, die gebildet wird, wenn sich freie Fettsäure mit Alkali verbindet, beschleunigt wesentlich den Emulsionsprozefs. Wird ein neutrales Fett mit verdünntem Alkali geschüttelt, so findet keine Emulsion statt, wird jedoch das Fett ranzig, d. h. wird etwas freie Fettsäure gebildet, so findet rasch eine Emulsionbildung statt.

Claude Bernard stellte als erster fest, dafs bei der Verdauung des Fettes der Pankreassaft eine höchst wichtige Rolle spielt. Er machte auf die Thatsache aufmerksam, dafs beide Erscheinungen

Digitized by Google

unter dem Einfluſs desselben vor sich gehen, indem er zeigte, daſs beim Schütteln von neutralem Öl und Pankreassaft rasch eine Emulsion sich bildet, und daſs sich weiter bei der Einwirkung des Pankreassaftes auf Öl freie Fettsäure bildet. Nach seiner Meinung dauerte die chemische Veränderung viel länger als die physikalische. Manche Physiologen sind der Ansicht, daſs beide durch die Wirkung der Enzyme bewirkt werden, die man Emulsions- bezw. Verseifungs-Enzyme nannte. Zwanzig Jahre später wurde festgestellt, daſs es keine Emulsions-Enzyme gebe, sondern daſs die Emulgierung auf die freie Fettsäure zurückzuführen sei, die bei der Verseifung gebildet werde. Unter den Forschern, auf deren Untersuchungen diese Ansicht basiert, mögen *Brücke* und *Gad* genannt sein. Das Enzym ist von den verschiedenen Forschern mit verschiedenen Namen belegt worden; so wurde es Pialyn, Steapsin und neuerdings Lipase genannt. Die von ihm bewirkte Zersetzung läſst sich durch folgende Gleichung ausdrücken:

$$C_3H_5(C_{18}H_{35}O_2)_3 + 3\,H_2O = C_3H_5(OH)_3 + 3\,(C_{18}H_{35}O\,HO)$$

Stearin Glycerin Stearinsäure,

die die Hydrolyse des Stearins, eines neutralen Fettes, repräsentiert.

Das Enzym, das wir nach der neuesten Terminologie Lipase nennen wollen, kann im Pankreassaft nachgewiesen werden, wenn man diesen durch in den Drüsenkanal eingeführte Kanülen sammelt, oder aber es kann aus einer frischen Drüse mit Glycerin oder Wasser ausgezogen werden. Es ist wichtig, daſs dabei ein neutrales Lösungsmittel genommen wird, da das Enzym durch Säuren leicht geschädigt wird. Lipase ist auch im Pflanzenreich gefunden worden, wo es bei der Nutzbarmachung der Fettreservestoffe mancher Samen eine Rolle spielt. Während der Keimung wird das Fett unter Bildung freier Fettsäuren zersetzt. Der Emulsionsprozeſs tritt dabei nicht wie im Tierkörper auf.

Die Lipase ist im Tierreich sehr weit verbreitet. Bei den Säugetieren findet sie sich in der Haupsache im Pankreas, aus dem sie leicht extrahiert werden kann. Sie soll auch im Magen vorkommen, doch in kleinerer Menge.

Hanriot, der es im Blute verschiedener Wirbeltiere entdeckte, hat seine Wirkung auf Monobutyrin geprüft. Er giebt an, daſs dieser Körper vom Blutserum in neutraler oder schwach alka-

Digitized by Google

lischer Lösung leicht verseift werde; doch ist ein vorsichtiger Zusatz von Alkali während des Vorganges nötig, denn dieser wird durch die gebildete freie Fettsäure unterbrochen, sobald diese eine gewisse Menge übersteigt. Das Serum verliert seine Fähigkeit, das Monobutyrin zu hydrolysieren, beim Erwärmen auf 90° C.

Cohnstein und *Michaelis* beobachteten ebenfalls die Fähigkeit des Blutes, das Fett aus dem Chylus zum Verschwinden zu bringen, was sie auf Rechnung einer lipolytischen Substanz der roten Blutkörperchen setzen.

Auch bei den wirbellosen Tieren findet man die Fähigkeit, Fett zu hydrolysieren. *Fredericq* extrahierte aus Schwämmen eine Substanz, die mit neutralen Fetten eine Emulsion bildete und sie schliefslich in Fettsäuren und Glycerin zerlegte. Derselbe Körper kommt in Uraster, einem Echinodermen vor, auch in der sogenannten Leber der Spinne und der efsbaren Schnecke, in der letzteren nur im Sommer. Die „Leber" mehrerer Krustaceen giebt einen Auszug mit scheinbar denselben Eigenschaften; er macht nämlich die Milch durchscheinend. Das entsprechende Organ in gewissen Cephalopoden hat die gleiche Wirkung; es hydrolysiert ebenfalls neutrale Fette. Lipase hat man auch aus der Leber der Sepia dargestellt. Die Eier verschiedener Krustaceen enthalten neben anderen Enzymen, wie *Abelaus* und *Heim* gezeigt haben, auch Lipase.

Man kann die Lipase in einer Lösung, Ausscheidung oder in einem Auszug mittelst einer aus klein gepulvertem Gummi arabicum und sehr wenig Wasser dargestellten Emulsion nachweisen. Diese Emulsion mischt man mit dem Auszug und neutralisiert sorgfältig, da das Gummi manchmal eine sauere Reaktion aufweist. Das Ganze kann dann bei 40° C. unter Zusatz von wenig Lackmuslösung digeriert werden. Bei Anwesenheit des Enzyms wird die Flüssigkeit durch die in Freiheit gesetzte Fettsäure rot. Die Schnelligkeit, mit der der Farbenwechsel eintritt, gestattet einen Schlufs auf die Menge der vorhandenen Lipase.

Eine andere Methode des Lipasenachweises in kleineren Mengen beruht auf *Gads* Versuchen über die freiwillige Emulgierung beim Vermischen von freien Fettsäuren und Öl mit geeigneten Mengen verdünnter Sodalösung. In diesem Falle mufs

Digitized by Google

man schütteln, wobei die Gesamtflüssigkeit emulgiert. *Gads* Methode ist folgende:

0,25 prozentige Sodalösung wird auf eine Anzahl Uhrgläser verbracht; auf diese Lösung läfst man Öltropfen mit verschiedenem Gehalt an Fettsäuren fliefsen. Bei einem gewissen Prozentgehalt an freier Fettsäure im Öl entsteht die Emulsion plötzlich und vollständig; bei mehr oder weniger Fettsäure ist die Emulsion mehr oder weniger vollständig. Bei einer 0,25 prozentigen Sodalösung und bei 18° C. mufs das Öl 5,5 % freie Fettsäure enthalten. Das Emulsionsmittel ist in diesem Falle die aus den freien Fettsäuren und dem Alkali gebildeten Seife. Gummi arabicum ist hier nicht nötig.

Das Auftreten einer spontanen Emulsion ist daher ein höchst geeignetes Mittel zum Nachweis freier Fettsäuren. Bei Benutzung gänzlich neutralen Öles wird bei der Digestion mit Lipase enthaltenden Lösungen das Enzym die zur Emulsion genügende Menge Fettsäuren in Freiheit setzen, wobei die Vollständigkeit der Emulgierung von der Menge der in Freiheit gesetzten Fettsäuren abhängig sein wird.

Diese Methode benutzte *Rachford* bei einer Versuchsreihe über den Lipasegehalt des Pankreassaftes und gleichzeitig über gewisse mit der Verdauung des Fettes im Dünndarm in Verbindung stehende Probleme. *Rachford* erhielt den Pankreassaft mittelst einer in den Pankreaskanal eines Kaninchens eingeführten Kanüle, indem er den daraus ausfliefsenden Saft auffing. Er mischte eine kleine Menge des Saftes mit seinem zweifachen Volumen neutralen Olivenöles in kleinen Probierröhrchen, schüttelte durch und liefs absitzen. Die Trennung der beiden Flüssigkeiten erfolgte fast unmittelbar. Dann brachte er einen Tropfen des oben schwimmenden Öles auf die Oberfläche einer 0,25 prozentigen Sodalösung und beobachtete, ob eine Emulgierung stattfand. Nach einigen Minuten wiederholte er die Operation und fuhr eine Zeitlang so fort. Auf diese Weise konnte er feststellen, dafs die Fähigkeit, eine Emulsion zu bilden, sich in dem Öl allmählich entwickelte. Notwendigerweise folgt hieraus, dafs in dem Pankreassaft Lipase enthalten ist, und dafs sie allmählich einen Teil des neutralen Öles zersetzte. *Rachford* giebt an, dafs die Alkalität des Saftes nicht genügte, die frei-

Digitized by Google

gewordene Fettsäure zu binden, so dafs das Gemisch im Proberöhrchen keine Emulsion bildete.

Die Lipase des Pankreas scheint durch die freie Fettsäure nicht ebenso gehindert zu werden, als dies *Hanriot* für das Blutenzym angiebt. Sie zersetzt die meisten neutralen Fette, doch ist ihre Wirkung auf Ricinusöl verhältnismäfsig schwach. Sie hydrolysiert nicht nur die Fette, die bei Körpertemperatur flüssig sind, sondern auch feste, z. B. Walrat, obwohl ihre Wirkung auf diesen sehr schwach ist.

Beim Verdauungsprozefs der Fette im Eingeweide wird die Wirkung der Lipase durch die im Speisebrei beim Verlassen des Magens enthaltene Säure und durch die Galle beeinflufst, die sich gleichzeitig mit dem Pankreassaft in den Zwölffingerdarm ergiefst. *Rachford* fand, dafs der Zusatz eines gleichen Volums Galle zum extrahierten Saft und Öl im Probierröhrchen die Wirkung der Lipase um das $3^1/_5$fache erhöht. Setzt man statt der Galle 0,25prozentige Salzsäure hinzu, so wird die Wirkung wesentlich vermindert. Werden dagegen beide gleichzeitig zugesetzt, so wird die Hydrolyse des Öles ums 4fache erhöht. Der Einflufs der Galle rührt hauptsächlich von deren Gehalt an glykocholsaurem Natron her. *Rachford* fand, dafs die Wirkung der Lipase durch einen Überschufs an Alkali wesentlich herabgesetzt wird.

Die Lipase scheint in einem gröfseren Mafsstabe beim Verdauungsprozefs beteiligt zu sein als man früher annahm. Viele Forscher nahmen an, dafs das Fett durch das Eingeweide-Epithel in der Form einer Emulsion aufgesaugt werde und dafs die Arbeit der Lipase zu Ende sei, wenn die zur Hervorbringung der Emulsion nötige Menge Seife aus dem Fett gebildet worden sei. Neuere Forschungen haben diese Ansicht in Frage gestellt und wahrscheinlich gemacht, dafs der gröfste Teil des Fettes hydrolysiert und entweder als freie Fettsäure oder als Seife absorbiert wird. Die Emulsion kann als Mittel zur Unterstützung der weiteren Hydrolyse und Verseifung betrachtet werden. Es liegt jedoch ein weiteres Eingehen auf diesen Gegenstand aufserhalb des Rahmens dieses Buches.

Die Wirksamkeit der Lipase ist wie die der anderen Enzyme wesentlich durch die Temperatur beeinflufst. Die günstigste Temperatur für ihre Thätigkeit ist nicht, wie man erwarten sollte,

Digitized by Google

die Körpertemperatur, sondern 55° C. Sie hat bezüglich ihrer Thätigkeit nicht einen so grofsen Spielraum wie einige andere Enzyme; bei 60° C. ist ihre Wirksamkeit schon wesentlich verlangsamt, und bei 72° wird sie wirkungslos. Beim Punkt ihrer besten Wirksamkeit ist die Hydrolyse proportional der Menge der Lipase.

Hanriot hat vergleichende Versuche mit Lipasen verschiedenen Ursprunges angestellt. Am interessantesten war der Vergleich zwischen dem Enzym des Serums und dem des Pankreassaftes des Hundes. Er stellte die beiden Lipaselösungen in einer Stärke her, dafs sie unter normalen Bedingungen auf Monobutyrin bei Gegenwart von etwas Soda von gleicher Wirkung waren. Wurden die Lösungen neutralisiert und 20 Minuten wirken gelassen, so war die vom Serum gebildete Menge freier Säure fast doppelt so grofs als die der Pankreaslösung. Es scheint daher die Serumlipase bei Gegenwart der Reaktionsprodukte energischer als die Pankreaslipase zu sein. Lösungen der beiden Lipasen, die bei 15° C. die gleiche Wirksamkeit hatten, wurden bei verschiedenen Temperaturen geprüft. Bei 38° C. zeigte die Serumlipase die $1^1/_2$fache, bei 42° fast die zweifache Wirkung. Die Pankreas-Lipase zeigte innerhalb dieses Temperatur-Intervalles keine Änderung. Die Serumlipase behielt ihre Wirksamkeit mehrere Monate lang unter antiseptischen Bedingungen, während die Pankreaslipase nach einigen Tagen keine Wirkung mehr hatte.

Hanriot giebt an, dafs die aus Pferdeserum hergestellte Lipase durch schwache Alkalien wesentlich gefördert wird. In einem Falle fand er, dafs die Gegenwart von 0,2 % Soda die Produktion der Fettsäuren ums 4fache erhöhte.

Lipase kommt sowohl im Pflanzenreich als im Tierreich vor. Das sehr häufige Vorkommen von Öl in den Samen legt die Vermutung nahe, dafs ein ganzer Teil der Kohlenstoffsubstanz in dieser Form als Embryo-Nahrung aufgespeichert wird. Es ist bemerkenswert, dafs Öl und Stärke selten zusammen in den Samen vorkommen. Der Umwandlung der Ölreservestoffe in vielen Endospermen während der Keimung folgt jedoch sehr rasch das Auftreten von Stärke in den jungen Pflanzen, in die die Produkte der durch die Keimung hervorgerufenen Abbauprozesse wandern. Die Ansicht, dafs dies auf eine direkte Umwandlung

Digitized by Google

von Öl in Stärke hinweise, wurde von manchen Forschern ausgesprochen und stützte sich natürlich in den meisten Fällen auf die Thatsache, dafs das Fett verschwindet und die Stärke auftritt. Dieser Ansicht huldigte z. B. im Jahre 1859 *Sachs*, und andere Forscher folgten ihm darin. Im Jahre 1871 äufserte *Müntz* eine mehr begründete Ansicht, indem er feststellte, dafs während der Keimung in den Samen eine Fettsäure gebildet wird, was auf eine hydrolytische Spaltung des Fettes hinweist. *Schützenberger* zeigte im Jahre 1876, dafs ein öliger Samen beim Zerreiben im Wasser eine Emulsion bildet, in der man bei sorgfältiger Beobachtung bald die Anwesenheit sowohl von Glycerin als auch von Fettsäure nachweisen kann. Er meinte, dafs sich offenbar eine Hydrolyse abspiele und führte diese auf ein Enzym zurück. *Detmar* versuchte im Jahre 1880 die neue Theorie mit der alten durch die Annahme zu versöhnen, dafs die bei der Hydrolyse auftretende Fettsäure der unmittelbare Vorgänger der Stärke sei, er stellte hierfür folgende theoretische Gleichung auf:

$$C_{18}H_{34}O_2 + 27\,O = 2\,C_6H_{10}O_5 + 7\,H_2O.$$

Es ist jedoch wahrscheinlich, dafs keine Annahme, auf die sich die direkte Überführung des Öls in Stärke stützt, den Verlauf des Prozesses zu erklären vermag, denn weder Öl noch Stärke sind diffusibel, und da beide Körper an ziemlich weit auseinanderliegenden Stellen auftreten, getrennt durch eine ganze Anzahl Zellmembranen, so kann zwischen dem Verschwinden des einen und dem Auftreten des anderen kein direkter Zusammenhang gefunden werden.

Das Enzym, das *Schützenberger* vermutete, hat der Verfasser im Jahre 1889 in den keimenden Samen von Ricinus entdeckt. Die Samen liefs man 5 Tage keimen, bis der Embryo eine ziemlich beträchtliche Gröfse erreicht hatte und die Wurzeln sich kräftig entwickelt hatten. Das Endosperm war an der Stelle geschwollen und halb schleimig, wo es mit den Kotyledonen in Berührung stand. Es wurde im Mörser mit einer Lösung von 5 % Kochsalz und 0,2 % Cyankalium zerkleinert, wobei letzteres als Antisepticum diente. Nach 24stündigem Stehen wurde die Flüssigkeit annähernd klar filtriert; sie war immer noch schwach opalescierend. Dann wurde eine dicke Ricinusölemulsion hergestellt, etwas von dem Auszug dazu gemischt und gleichzeitig etwas neutrale Lack-

Digitized by Google

muslösung zugegeben. Eine gekochte Kontrollprobe wurde daneben angestellt, beide wurden bei 35° im Brutschrank gehalten. In etwa einer halben Stunde begann sich der Lackmus in der ungekochten Probe zu röten, was auf die Bildung freier Fettsäuren hinwies. Diese wurden der Mischung durch Schütteln mit verdünnter Sodalösung entzogen, wobei die Säuren mit dem Alkali lösliche Seifen bildeten. Die Seifen wurden dann mit einer Mineralsäure zersetzt, wobei die Fettsäuren alsbald als Schaum an die Oberfläche stiegen.

Bei einem weiteren Versuch liefs man eine gröfsere Menge der Emulsion, die in derselben Weise mit Ricinussamenauszug behandelt war, im Dialysator digerieren, der in destilliertem Wasser hing. Die Digestion dauerte eine Woche. Während dieser Zeit wurde die Reaktion im Dialysator mehr und mehr sauer, während die der umgebenden Flüssigkeit unverändert blieb. Nach Ablauf einer Woche wurde das Dialysat eingeengt und auf Glycerin geprüft, das mittelst der Acroleïnprobe nachgewiesen wurde. Ein Kontrollversuch mit aufgekochtem Auszug liefs keinen Wechsel in der Reaktion erkennen und im Dialysat war kein Glycerin. Die Versuche ergaben also die Gegenwart der Lipase, ferner, dafs diese das Öl unter Bildung von Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysierte, wobei ersteres ins Dialysat überging, letztere dagegen nicht. Viele Wiederholungsversuche bestätigten diese Ergebnisse.

Eine Prüfung der Eigenschaften der Lipase ergab, dafs sie am besten in neutraler Lösung arbeitete; sie war auch noch in verdünnten Alkalien wirksam, jedoch in viel schwächerem Mafse in verdünnten Säuren. Die Wirksamkeit wurde durch das Alkali gemessen, das zur Neutralisation der gebildeten Säuren nötig war. Beim Vergleich dreier Digestionen, von denen die erste neutral war, die zweite 0,066 % Soda und die dritte 0,066 % Salzsäure enthielt, bildeten sich Säuren im Verhältnis 78 : 69 : 21. Salzsäure in der Menge von 0,13 % hemmte die Wirkung fast ganz; Soda reduzierte in einer Menge von 0,6 % die Wirkung auf die Hälfte. Bei längerer Einwirkung hemmten Salzsäure und Soda nicht nur die Wirkung des Enzyms, sondern zerstörten es völlig. Neutrale Salze, z. B. Kochsalz, hemmten die Wirkung des Enzyms, zerstörten es jedoch nicht.

Digitized by Google

Lipase ist nur in dem Endosperm des Ricinus vorhanden, der Embryo enthält das Enzym nicht. Das war auch zu erwarten, denn das Öl geht aus dem einen nicht in den anderen über, und die zeitweise im Embryo auftretende Kohlenhydratnahrung ist zum gröfsten Teil Stärke.

Im ruhenden Samen von Ricinus scheint keine Lipase vorhanden zu sein, doch weisen die gemahlenen Samen bei mehrstündigem Einlegen bei 35° C. in verdünnte Säure die Fähigkeit auf, Öl zu hydrolysieren. Ein Auszug aus dem ruhenden Samen, der mit schwacher Salzlösung bereitet, dann schwach angesäuert und warm gehalten wurde, veränderte sich ebenso. Zuerst ganz unwirksam, entwickelte er allmählich das Enzym, gerade so wie der Pankreas bei der gleichen Behandlung Trypsin entwickelt. Man kann daher annehmen, dafs die Lipase in den ruhenden Samen in der Form eines Zymogens existiert, welches mit Eintritt der Keimung in das Enzym selbst verwandelt wird. Die gleiche Umwandlung findet auch ohne Säure statt, wenn ein Auszug aus ruhenden Samen unter geeigneten antiseptischen Mafsregeln einige Tage steht.

Auf die weiteren Veränderungen, denen die Produkte der Hydrolyse unterliegen, sei hier kurz eingegangen. Die Fettsäuren werden von der Lipase nicht weiter angegriffen; die Ricinusölsäure wird auch bei längerer Berührung mit dem Enzym nicht weiter verändert. Während der Keimung verschwinden jedoch die Fettsäuren aus den Zellen, in denen sie gebildet werden; da sie nicht durch eine Membran diffundieren können, so werden sie offenbar zersetzt. Mit fortschreitender Keimung treten andere, krystallinische Säuren in den Zellen auf, deren Menge annähernd proportional ist dem Verschwinden der Fettsäuren. Es ist sehr wahrscheinlich, dafs die gewöhnlichen Oxydationsprozesse, die sich in den Zellen unter dem Einflufs des Protoplasmas abspielen, die höheren Fettsäuren in andere überführen, die die Zellen auf dem Wege der Dialyse verlassen können. Das Glycerin, das zweite Produkt der Hydrolyse, ist wahrscheinlich der Vorläufer irgend eines Zuckers, der durch das Gewebe wandert, vom Embryo aufgenommen wird und der Vorläufer der Stärke ist, die sich bald in den Zellen zeigt.

Das Vorkommen der Lipase wurde zwei Jahre darauf von

Digitized by Google

Sigmund dargethan, der es in den ruhenden und keimenden Samen von Raps, Mohn, Hanf, Flachs und Mais fand. Er zerrieb die Samen mit Wasser und bestimmte die freien Fettsäuren in der erhaltenen Emulsion. Er titrierte die Säuren mit Normalalkali gleich nach dem Verreiben und nachdem die Mischung 24 Stunden bei 30° C. gestanden hatte, und fand in allen Fällen, dafs alsdann gröfsere Mengen Alkali zur Neutralisation nötig waren. Es wurden also beim Stehen freie Fettsäuren gebildet, was zweifellos auf die Gegenwart von Lipase zurückzuführen war. *Sigmund* giebt an, dafs die von ihm geprüften ruhenden Samen eine gewisse Menge Enzym enthielten, welche durch die Keimung vergröfsert wurde.

Es wurde bereits erwähnt, dafs *Sigmund* dem Myrosin und Emulsin die Fähigkeit zuschreibt, Öl zu hydrolysieren. Wenn er diese Enzyme in geschlossenen Glasgefäfsen bei einer Temperatur von 38—40° C. auf Olivenöl einwirken liefs, so konnte er eine allmähliche und fortschreitende Bildung von freien Fettsäuren in dem Gemisch feststellen, deren Gegenwart sowohl durch Lackmus als auch durch Phenolphtaleïn festgestellt wurde.

Es ist nicht ganz sicher, ob die Versuchsergebnisse auf Emulsin bezw. Myrosin zurückzuführen sind; es ist vielmehr wahrscheinlicher, dafs Lipase die Ursache war, welches Enzym in den Samen neben den anderen Enzymen vorhanden war. Das Vorkommen von mehr als einem Enzym in einem Gewebe ist eine ganz allgemeine Erscheinung, sowohl im Pflanzen-, als im tierischen Organismus, wofür wir bereits zahlreiche Beispiele angeführt haben. *Sigmund* stellte seine beiden glukosidspaltenden Enzyme dar, indem er in einem Falle Senfkörner, im anderen Mandelkerne mit Wasser zerkleinerte und sie mit einem Überschufs von Wasser 12—14 Stunden stehen liefs. Er gofs dann die überstehende Flüssigkeit ab und versetzte sie mit Alkohol. Dadurch entstand ein Niederschlag, den er abfiltrierte, mit Alkohol wusch und bei etwa 40° C. trocknete. Nach dieser Methode erhielt er sicher kein reines Enzym; seine Fällung enthielt alle löslichen Eiweifsstoffe und alle in dem Samen enthaltenen Enzyme. Aus der Wirkung seines Pulvers mufs man zunächst auf einen Gehalt an Lipase schliefsen, und die natürliche Schlufsfolgerung ist die, dafs Senfsamen und Mandelkerne zu den Lipase enthaltenden

Digitized by Google

Samen zu rechnen sind und nicht, dafs die glukosidspaltenden Enzyme die Fähigkeit besitzen, Öl zu hydrolysieren. Die Zusammensetzung des Öls auf der einen und der Glukoside auf der anderen Seite spricht sehr gegen die Ansicht, dafs ein Enzym existiert, das beide zu zersetzen vermag.

Interessant ist auch die Angabe von *Sigmund*, dafs die Lipase Amygdalin und Salicin spalten könne. Nach seiner Annahme wären also Lipase und Emulsin praktisch dasselbe Enzym. Das erscheint aber in gleicher Weise unwahrscheinlich.

Die Keimung mehrerer ölhaltiger Samen ist auch von *Leclerc du Sablon* geprüft worden, der sich mit der Ricinuspflanze, dem Hanf, dem Winterraps und dem Flachs, aufserdem noch mit einigen weniger ölhaltigen Samen befafste. *Du Sablon* fand, dafs sich das Öl dieser Samen während der Keimung beträchtlich verminderte und dafs das Verschwinden des Öls einherging mit der Bildung von Zucker und zwar von Rohrzucker und Dextrose. Er verfolgte den Keimprozefs hauptsächlich durch zeitweise Analyse der Samen. Er gründete die Annahme, dafs das Öl dabei nicht hydrolysiert wird, darauf, dafs er kein Glycerin nachweisen konnte. Das ist jedoch nicht sehr überraschend, denn bereits viele andere Forscher haben nachgewiesen, dafs dieses in keimenden Samen nicht in nachweisbaren Mengen vorhanden ist. Man darf jedoch daraus nicht schliefsen, dafs es nicht gebildet wurde; denn es ist sehr leicht möglich, dafs es sofort nach seiner Bildung anderweitigen Zersetzungen unterliegt. *Du Sablon* versuchte nicht, es auf irgend eine Weise in den Samen anzuhäufen, daher kann seine Behauptung von der Nichtexistenz der Lipase nicht als einwandfrei gelten. Er machte auch nicht den Versuch, Öl mit einer Lipase enthaltenden Flüssigkeit zu zersetzen, sondern verliefs sich ganz auf seine Analysen.

Bei der Besprechung seiner Versuchsergebnisse spricht er die Vermutung aus, dafs eine modifizierte Lipase existiere, die zwar aus Öl freie Fettsäure abspalte, aber kein Glycerin in Freiheit setze; diese Fettsäuren stellen aber nur einen kleinen Teil des zersetzten Öles dar. Das Glycerinradikal des ganzen Öles zusammen mit der nicht in Freiheit gesetzten Fettsäure bildet aber direkt Zucker und zwar zunächst Rohrzucker und dann dextroseähnliche Zucker, die resorbiert werden. Auch transitorische Stärke tritt

Digitized by Google

während dieser Umwandlungen in den Samen auf, und schliefslich wird auch diese in Dextrin und Zucker umgewandelt.

Sowohl aus dem Auftreten des Rohrzuckers, als auch der Stärke schliefst er, dafs das Öl schneller zersetzt wird, als es die junge Pflanze benötigt, und deshalb betrachtet er sie als sekundäre und zeitweilig auftretende Reservestoffe. Er nimmt an, dafs in seinen Samenauszügen sowohl Invertase als auch Diastase vorhanden waren. In einigen Fällen, besonders bei dem Winterrapssamen (Brassica oleracea), nimmt er an, dafs die Dextrine als Zwischenprodukte zwischen dem Öl und dem nicht reduzierenden Zucker auftreten.

Bei der Betrachtung der Anschauungsweise *du Sablons* über den Verlauf der Umwandlungen kommt es sehr unwahrscheinlich vor, dafs die Fettsäuren als direkte Vorläufer der Kohlenhydrate gelten sollen. Es ist kein Beispiel für eine ähnliche Umwandlung vorhanden, und durch keinen Laboratoriumsversuch kann man sie beweisen. Die starke Betonung, die er auf das Nichtvorhandensein des Glycerins legt, ist auch bemerkenswert, denn es ist nicht schwer, es mit geeigneten Methoden nachzuweisen, wie der Verfasser im Verlaufe seiner Untersuchungen über Ricinus dargethan hat. Seine Gegenwart oder Abwesenheit erscheint als ein sehr wichtiges Anzeichen dafür, ob das betreffende Enzym als Lipase anzusprechen ist oder nicht.

Auch Penicillium glaucum enthält, wie bereits erwähnt wurde, mehrere Enzyme. Zu diesen mufs noch Lipase hinzugefügt werden. *Gerard* fand, dafs ein wässeriger Auszug dieses Pilzes Monobutyrin zu hydrolysieren vermag. Am besten weist man dies nach, indem man den Pilz in *Raulins* Flüssigkeit unter Zusatz von etwas Monobutyrin züchtet. Es bildet sich sehr schnell freie Buttersäure, gerade so wie mit *Hanriots* Lipase aus dem Blut. Im Hinblick auf *Sigmunds* Schlufsfolgerungen ist es bemerkenswert, dafs *Gerard* fand, dafs Emulsin Monobutyrin nicht hydrolysiert.

Die Versuchsergebnisse *Gerards* sind ganz unabhängig davon von *Camus* bestätigt worden, der ebenfalls Lipase in einem anderen Pilz, nämlich Aspergillus niger, fand.

Digitized by Google

Kapitel XV.

Die Gerinnungsenzyme (Lab).

Die vier Enzyme, die wir nunmehr betrachten, bilden eine Gruppe, dieauf den ersten Blick abgegrenzt erscheint und sich von den bereits besprochenen scharf abhebt. Das in die Augen springende ihrer Wirkung ist die Bildung einer Gallerte, die bald nach ihrer Bildung sich zusammenzieht oder schrumpft und schliefslich ein halbfaseriges Aussehen annimmt. Anstatt also aus einem an sich oft unlöslichen und nicht diffusiblen Körper einen leicht löslichen und diffusiblen zu bilden, scheinen sie diese Reihenfolge umzukehren. In zwei Fällen jedoch ist das Koagulum begleitet von einem anderen Produkt, das leichter oder doch nicht weniger löslich ist als der Ausgangskörper. Ein anderes Charakteristikum, das dreien dieser Enzyme gemeinsam ist, ist das, dafs die Wirkung dieser Enzyme gebunden ist an die Anwesenheit gewisser Kalksalze, ohne die die Gerinnung nicht vor sich geht. Es ist jedoch ungewifs, ob dies nicht nur eine nebensächliche Erscheinung ist, denn die Wirkung des unorganischen Salzes hat sich nicht in allen Fällen als die gleiche erwiesen.

Eins dieser Enzyme, gewöhnlich bekannt als Lab, kommt sowohl im Tierreich als auch im Pflanzenreich vor; das sogenannte Fibrinferment und das Enzym, das die Bildung von Myosin in den Muskeln bewirkt, finden sich nur im Tierreich. Die Pektase dagegen ist nur pflanzlichen Ursprungs. Die drei ersten sind proteolytische Enzyme; die Pektase bewirkt Veränderungen in den Stoffen, die die Zellmembranen der Pflanzen ausmachen.

Lab (Chymosin, Rennin).

Das erste der hier zur Besprechung gelangenden Enzyme ist das sogenannte Labenzym, das in der Käsebereitung eine

Digitized by Google

so ausgedehnte Anwendung findet. Fügt man eine kleine Menge dieses Körpers zu einer verhältnismäfsig grofsen Menge Milch, so gesteht diese rasch zu einer steifen Gallerte; nach kürzerer oder längerer Zeit schrumpft die Gallerte etwas zusammen und eine wässerige Flüssigkeit, die Molke, scheidet sich ab; nach einiger Zeit schwimmt ein fester Klumpen in der wässerigen Flüssigkeit.

Die Bildung dieses Klumpens, der in Wirklichkeit roher Käse oder Quarg ist, beruht auf der Veränderung eines der Milchbestandteile, nämlich des Kaseïns; dieses gehört zur Gruppe der Nucleo-Albumine, wird aber gewöhnlich als das Haupteiweifs der Milch angesprochen.

So wie es in der Milch enthalten ist, kann es leicht durch Zusatz von etwas verdünnter Säure ausgefällt werden; es scheidet sich alsdann in loser flockiger Form aus und kann durch Filtration leicht von der Flüssigkeit getrennt werden. Es kann dann wieder in verdünnten Alkalien gelöst und wieder ausgefällt werden.

Läfst man auf Kaseïn, sei es in der Milch, sei es in schwach alkalischer Lösung, Lab in Gegenwart von Calciumphosphat einwirken, so wird es mit einem Male chemisch verändert. Es bildet sich daraus ein Körper, dem man den Namen Tyreïn beigelegt hat und der das Eiweifs der geronnenen Milch ist. Nach Entfernung der Molke enthält das Tyreïn noch ein Nebenprodukt mit den Eigenschaften der löslichen Eiweifskörper; jedoch ist es nicht durch Kochen koagulierbar. Es ist also verschieden von dem Serumalbumin oder Laktalbumin, das in normaler Milch vorkommt. Die Bildung dieses Nebenproduktes bei der Einwirkung von Lab auf reines Kaseïn zeigt, dafs es ein Umwandlungsprodukt des Kaseïns ist. Das Gerinnen der Milch durch Lab ist daher nicht zu verwechseln mit dem Ausfällen des Kaseïns durch Säure. Im letzteren Falle kann die Fällung wieder gelöst werden und erweist sich dann unverändert; im ersteren Falle ist es zersetzt worden unter Bildung eines unlöslichen Quargs, der hauptsächlich aus Tyreïn besteht, und eines anders gearteten Eiweifsstoffes. Der Quarg unterscheidet sich von dem Kaseïn durch seinen relativ hohen Gehalt an phosphorsaurem Kalk, der bei dem Verbrennen als Asche zurückbleibt. Wird dieses Kalksalz daraus entfernt und dann der Quarg in verdünnten Alkalien

Digitized by Google

gelöst, so kann er durch Lab nicht wieder wie das Kaseïn gefällt werden. *Halliburton* glaubt, das es ein Kalkkaseat ist.

Die Terminologie der verschiedenen Forscher auf diesem Gebiet ist nicht einheitlich. Einige gebrauchen die Bezeichnung Kaseïn für das unveränderte Eiweifs und nennen das Eiweifs der geronnenen Milch Tyreïn, wie wir bei der vorstehenden Besprechung; andere nennen den letztgenannten Körper Kaseïn und bezeichnen das natürliche Milcheiweifs als Kaseïnogen, um anzudeuten, dafs aus ihm Kaseïn entsteht.

Die Hauptquelle des Labenzyms im Tierkörper ist die Magenschleimhaut; es kommt in besonders grofsen Mengen im Magen junger Tiere, hauptsächlich der Kälber, vor. Es kann jedoch fast aus jedem Tiermagen gewonnen und mufs als ein normaler Bestandteil des Magensaftes angesehen werden. Es kommt im Pankreas mehrerer Tiere vor, besonders in dem des Schweines, des Ochsen, des Schafes, des Pferdes, des Hundes und der Katze, ebenso im menschlichen Pankreas. *Halliburton* und *Brodie* fanden es im Hunde-Pankreassaft, der mittelst einer in den Pankreaskanal eingeführten Kanüle erhalten wurde. *Edmunds* stellte es aus verschiedenen Geweben des Körpers dar, so aus der Hode, der Leber, der Lunge, der Niere, der Milz, der Brustdrüse, der Schilddrüse, dem Hirn, dem Eingeweide und dem Eierstock; doch war es in all diesen Organen nur in kleiner Menge enthalten. Auch wies er es in kleiner Menge im Blut nach. *Benger* stellte es aus dem Magen des Kabeljaus dar, und jedenfalls findet es sich auch im Magen des Hechtes. *Roberts* erhielt es aus den Verdauungsorganen des Geflügels und *Harris* und *Gow* extrahierten es aus dem Pankreas des Adlers. Es steht auch fest, dafs es in kleiner Menge im Urin vorkommt; das ist jedoch jedenfalls nur ein Zeichen dafür, dafs es von dem Körper ausgeschieden wird. Im Pflanzenreich ist es sehr verbreitet, darüber handelt jedoch ein späteres Kapitel.

Die Darstellung des Labs in unreinem Zustand aus dem Magen oder Pankreas ist sehr leicht. Man zerkleinert das Organ fein, entweder in frischem Zustand, oder nach dem Entwässern mit Alkohol und zieht dann die Masse mit Glycerin oder neutralen Salzlösungen aus. Macht man das Lösungsmittel schwach sauer, so erhält man ein wirksameres Präparat als mit ganz

Digitized by Google

neutraler Lösung. Am zweckmäfsigsten extrahiert man mit einer 5—10 prozentigen Kochsalzlösung.

Man hat viele Versuche gemacht, das Enzym rein, frei von anderen Enzymen und Eiweifsstoffen, darzustellen. Die ersten Versuche in dieser Richtung machte *Deschamps* im Jahre 1840, doch ohne Erfolg. Die Trennung führte jedoch *Hammarsten* aus, der seine Methode im Jahre 1872 veröffentlichte. Sie besteht in der fraktionierten Fällung eines sauren wässerigen Auszugs des Magens mittelst Magnesiumkarbonat oder Bleizuckerlösung. Sowohl Pepsin als Lab fallen aus, Pepsin jedoch schneller. Dadurch ist es ermöglicht, die Flüssigkeit von Pepsin zu befreien, während der gröfsere Teil des Labs in Lösung bleibt. Nach dem Filtrieren fällt ein weiterer Zusatz von Bleiessig das Labenzym aus, was man noch durch Zufügen von etwas Ammoniak unterstützen kann. Der Niederschlag wird abfiltriert, in Wasser suspendiert und mit sehr verdünnter Schwefelsäure zersetzt. Diese saure Lösung, die nur Spuren Eiweifs enthält, wird mechanisch nach *Brückes* Methode zur Trennung des Pepsins gefällt und zwar, wie beschrieben wurde, mittelst Cholesterin.

Diese Methode ist dann von Nutzen, wenn das Labenzym in grofser Menge vorhanden ist, sie hat aber stets einen grofsen Verlust an Material zur Folge.

Einige Jahre später wurden das Labenzym und das Trypsin des Pankreasauszuges von *Roberts* nach folgender Methode getrennt: Ein Salzauszug des Pankreas wurde mit Salzsäure schwach angesäuert und 3 Stunden bei 40° gehalten. Nach der Neutralisation war das Trypsin zerstört, während das Labenzym unverändert war. *Roberts* giebt ferner an, dafs beim Filtrieren des Auszugs durch Porzellan unter Druck das Labenzym durch das Filtermaterial hindurch geht und das Trypsin zurückbleibt.

Im Jahre 1886 schlug *Blumenthal* einen anderen Weg ein. Er zerschnitt Kälbermagen in kleine Stücke, weichte sie 24 Stunden bei etwa 30° C. in eine 0,5 prozentige Kochsalzlösung ein. Dadurch entsteht eine dicke Ausscheidung einer schleimigen Substanz, die mechanisch entfernt werden kann, wobei die Enzyme in Lösung bleiben. Man erhöht den Säuregehalt auf 0,5 % und sättigt mit gepulvertem Kochsalz. Dann hält man die Mischung 2—3 Tage unter öfterem Umrühren bei 25—30° C., worauf man die Temperatur allmählich auf 30—35° C. steigert. Nach ein- bis

Digitized by Google

zweitägigem Stehen scheidet sich ein weifser flockiger Schaum aus, der leicht durch Abheben oder Filtrieren entfernt und bei etwa 28° C. getrocknet werden kann. Auf diese Weise erhält man eine weifse gelatinöse Substanz, die dem Thonerdehydrat sehr ähnlich sieht. Sie ist geruch- und geschmacklos, leicht und klar löslich in Wasser. Dieser Niederschlag ist fast reines Labenzym; eine kleine Menge desselben bewirkt Koagulation der Milch. Die Mutterlauge, aus der es gewonnen ist, hat diese Eigenschaft nicht, weist jedoch eine sehr hohe peptische Wirkung auf.

Blumenthal behauptet, nach derselben Methode könne man die zwei Enzyme aus der sogenannten Pepsinessenz des Handels darstellen, die sehr unrein ist.

Friedburg fand bei der Wiederholung der *Blumenthal*schen Versuche, dafs das lange Stehen nach der Sättigung mit Salz nicht immer nötig war, sondern dafs sich das Labenzym bei Benutzung verhältnismäfsig kleiner Salzmengen sofort abscheidet. Er empfiehlt seine sofortige Absonderung, denn beim Stehen zeigt es Neigung in der Flüssigkeit zu Boden zu sinken.

Hammarsten giebt für sein gereinigtes Produkt folgende charakteristische Reaktionen an:

1. Es zeigt nicht die Xanthoproteïn-Reaktion.
2. Seine wässerige Lösung koaguliert nicht beim Kochen.
3. Es wird von Alkohol, Salpetersäure, Tannin, Jod oder neutralem Bleiacetat nicht gefällt.
4. Es wird von basischem Bleiacetat gefällt.

Friedburg fand, dafs sein nach *Blumenthals* Methode dargestelles Präparat dieselben Reaktionen gab.

Die Wirkung höherer Temperaturen auf das Labenzym ist bis zu einem gewissen Grade abhängig von der Reaktion der Lösung. Am besten wirkt es bei 40° C. Neutrale Lösungen bleiben noch wirksam, nachdem sie kurze Zeit auf 70° C. erhitzt wurden; längere Zeit auf diese Temperatur erhitzt, werden sie jedoch unwirksam. Setzt man das Enzym einer höheren Temperatur aus, wenn auch nur auf Augenblicke, so wird es zerstört. Bei einem Gehalt der Lösung von 0,3% Salzsäure übersteht das Enzym nicht ein Erhitzen auf 63° C. Auch bei längerem Halten auf 40° C. wird das Enzym sehr geschwächt. Die Gegenwart von wenig Alkali hat dieselbe Wirkung.

Digitized by Google

Das Labenzym wirkt in neutraler oder schwach saurer oder alkalischer Lösung; bei Gegenwart von etwas mehr als der zulässigen Menge Säure oder Alkali wird das Enzym schnell bei gewöhnlicher Temperatur zerstört. *Hammarsten* fand, dafs die Gerinnung bei Benutzung eines schwach sauren Auszugs am schnellsten vor sich geht: *Ringer* hat diese Beobachtung bestätigt, indem er bei der Fällung des Kaseïns Säure in unzureichender Menge vorsichtig zusetzte. Die Gerinnung wurde nicht durch die Einwirkung der Säuren auf das Kaseïn bewirkt, da die gleiche Menge Säure ohne Lab keine Wirkung auf die Milch hatte. *Roberts* giebt an, das pankreatische Labenzym unterscheide sich vom Magenenzym dadurch, dafs es bei Anwesenheit gröfserer Mengen von Alkali noch wirksam sei. Alkohol in kleinen Mengen schädigt das Enzym nicht, gröfsere Mengen jedoch und längere Einwirkungsdauer zerstören es.

Neutrale Salze, z. B. Kochsalz oder Magnesiumsulfat in stärkerer Konzentration als 4 %, hemmen die Wirkung, zerstören jedoch nicht das Enzym. Kleine Mengen unter 1 % sind fördernd.

Die Wirkung des Labs wird durch die Gegenwart von Pepton und einiger Arten von Proteose wesentlich gehemmt. *Edmunds* hat hierüber sehr interessante Untersuchungen veröffentlicht, die im Hinblick auf die Wirkung derselben Eiweifsstoffe bei dem Gerinnungsprozefs des Blutes von besonderer Bedeutung sind. Er mischte in verschiedenen Röhren 10 ccm Milch mit wechselnden Mengen von *Wittes* Pepton, das Proteosen enthält, und 150 cmm eines Labpräparates und setzte das ganze einer Temperatur von 40° C. aus. Bei Abwesenheit von Pepton trat die Gerinnung in 10 Minuten ein; bei Gegenwart von 0,625 % Pepton erst nach 20 Minuten, bei 2.5 % erst nach 45 Minuten und durch 5 % Pepton wurde die Gerinnung um mehrere Stunden verzögert.

Es wurde bereits erwähnt, dafs die Kalksalze eine wichtige Rolle bei der Wirkung dieses Enzymes spielen. Am ausgesprochensten wirkt phosphorsaurer Kalk; in der That findet nach den Beobachtungen sehr vieler Forscher beim Fehlen dieses Salzes keine Gerinnung der Milch statt. Man kann diesen Versuch in der Weise anstellen, dafs man die Milch bis zum Verschwinden der Salze dialysiert; alsdann ist Lab ohne Wirkung

Digitized by Google

auf die Milch. Die gleiche Wirkung kann man beobachten, wenn man mit einem reinen Kaseïnpräparat experimentiert, das durch Fällen aus Milch mittelst verdünnter Essigsäure, Filtrieren und rasches Auswaschen mit destilliertem Wasser gewonnen wurde. Eine wässerige Lösung dieses Kaseïns gerinnt mit Lab nicht. Löst man es jedoch in Kalkwasser und neutralysiert man die Lösung vorsichtig mit Phosphorsäure, so erhält man eine milchähnliche Flüssigkeit, die sich genau wie die Milch verhält und bei Zusatz von Lab sogar noch schneller gerinnt. In dieser Beziehung ist es bemerkenswert, dafs Käse stets einen gewissen Gehalt an phosphorsaurem Kalk aufweist. *Ringer* giebt an, dafs andere Kalksalze, insbesondere Chlorcalcium, das Phosphat vertreten können.

Hammarsten, dem wir unsere Kenntnisse über das Enzym in der Hauptsache verdanken, erklärt die gegenseitige Wirkung in der Weise, dafs das Enzym die Umwandlung des Kaseïns in Tyreïn bewirke und das Kalksalz letzteres im Quargzustande ausscheide. Er schliefst dies aus folgendem Versuch.

Reines, aschefreies Kaseïn wurde in verdünntem zweibasischem phosphorsaurem Natron gelöst und die Lösung in zwei Teile, A und B, geteilt. A wurde mit Lab behandelt und dann wurden beide eine halbe Stunde bei 30° C. digeriert. A wurde dann zur Zerstörung des Enzyms aufgekocht, ebenso wurde B, um es vergleichbar zu machen, aufgekocht. Dann wurde dieselbe Menge Lab, die zu A zugegeben worden war, aufgekocht und zu B gegeben. Nach dem Abkühlen fügte man zu jeder Probe dieselbe Menge Chlorcalcium. A, worin das Labenzym 30 Minuten ohne äufsere Anzeichen eine Veränderung gewirkt hatte, gab sofort einen dicken Niederschlag von Tyreïn; B dagegen, worin Labenzym nicht thätig gewesen war, blieb unverändert. Das Geronnene scheint daher kein Tyreïn zu sein, sondern eine Verbindung desselben mit Kalksalz. *Ringer* hat über ähnliche Versuche berichtet, die die Ergebnisse von *Hammarsten* vollauf bestätigen.

Der Anteil, den die Kalksalze bei der Reaktion haben, erklärt vielleicht die hindernde Wirkung des Peptons. Dieses kann sich mit den Salzen verbinden, und die Gerinnung kann dadurch verhindert werden, dafs das Pepton die Salze aus der Lösung

Digitized by Google

wegnimmt. Hierüber sind jedoch noch weitere Versuche nötig, ehe man eine bestimmte Erklärung geben kann.

Auch der Wassergehalt der Milch kommt bei ihrer Gerinnung in Betracht. *Mayer* fand, dafs Milch, die in 25 Minuten normalerweise gerann, nach Zusatz von 5 % Wasser zur Gerinnung 30 Minuten Zeit brauchte; ein weiterer Wasserzusatz verzögerte die Gerinnung immer mehr; bei 20 % Wasserzusatz waren dazu bei derselben Temperatur und gleicher Labmenge 70 Minuten nötig. Die Gerinnung in verdünnter Milch ist flockiger als in normaler.

Die Verdünnung des Labauszuges hat in dieser Beziehung eine noch viel gröfsere Wirkung. *Soxhlet* fand, dafs bei der Einwirkung von 1 Teile Labpräparat auf 10000 Teile Milch die Gerinnung in 40 Minuten eintrat. Wurde jedoch dieselbe Menge Lab mit 500 Teilen Milch gemischt, so trat die Gerinnung in 2 Minuten 6 Sekunden ein. Aus seinen Versuchen schlofs er, dafs die zur Gerinnung erforderliche Zeit umgekehrt proportional war der benutzten Labmenge. Bei Anwendung kleinerer Mengen des Enzyms jedoch hielt diese Beziehung nicht Stich. Der Verfasser fand, dafs 1 ccm eines aus keimenden Ricinussamen erhaltenes Labpräparates 5 ccm Milch in 2 Minuten zur Gerinnung brachte, 0,2 ccm des Enzyms brauchten hierzu jedoch 4 Stunden. In einer anderen Versuchsreihe, in der der Auszug verdünnt wurde, so dafs die in jedem Falle zugesetzte Menge Flüssigkeit dieselbe war, wurde das gleiche Ergebnis erhalten: 1 ccm brachte 5 ccm Milch in 5 Minuten, 0,125 ccm verdünnt mit 0,875 ccm Wasser brachte 5 ccm Milch erst nach 5 ½ Stunden zum Gerinnen.

Der Charakter des Quargs hängt auch sehr erheblich von der Art der Milch ab. Wird Kuhmilch durch Lab koaguliert oder durch Säuren gefällt, so ist das ausgefällte Kaseïn fester als bei der Gerinnung von Frauenmilch. Der Quarg der Frauenmilch ist stets von loser, flockiger Beschaffenheit. Die Beschaffenheit des Quarges, der von dem Labenzym des Magens gebildet wird, hängt in der Hauptsache von drei Faktoren ab:

1. von der Konzentration der Kaseïnlösung,
2. von dem Gehalt an löslichem Calciumphosphat,
3. von dem Säuregehalte der Milch.

16*

Digitized by Google

Beim Vergleich der Kuhmilch mit der Frauenmilch findet man, dafs erstere etwa doppelt so viel Kaseïn enthält als letztere und sechsmal so viel Calcium, während sie dreimal so sauer ist als Frauenmilch. Es ist daher natürlich, dafs das Koagulum der letzteren flockig ist, während es bei der Kuhmilch kompakt und lederartig ist. Durch Verdünnung mit Wasser und annähernde Gleichstellung der Reaktion kann man die Kuhmilch so verändern, dafs sie beinahe ebenso koaguliert wie Frauenmilch. Doch ist wegen der überwiegenden Menge des Calciumphosphates in der Kuhmilch stets etwas Unterschied zwischen beiden vorhanden.

Lab ruft auch in gekochter Milch Gerinnung hervor, doch ist der Quarg sehr flockig, und man braucht eine beträchtliche Menge des Enzyms zur Koagulation. Diese Unterschiede sind um so gröfser, je höher die Temperatur war und je länger die Milch erhitzt wurde.

Ehe wir das Kapitel von der Wirkung des Labs auf die Milch schliefsen, scheint es angebracht, noch einige Wirkungsweisen des Enzyms zu besprechen, wenn diese auch jetzt bestritten werden. In erster Linie behauptet man, dafs das Labenzym auf Milchzucker einwirke und dieses in Milchsäure verwandle, welche ihrerseits die Gerinnung der Milch veranlasse. *Liebig* sprach im Jahre 1865 diese Ansicht aus und vermutete, dafs die Milchsäure das Alkali neutralisiere, das das Kaseïn in Lösung hält, und so letzteres fälle.

Soxhlet hatte eine etwas andere Auffassung. Er meinte, dafs der Unterschied zwischen der Koagulation der Milch mittelst Lab und der Gerinnung der Milch beim Stehen nur darin bestehe, dafs erstere schneller von statten gehe. Nach ihm verwandelt das Labenzym den Milchzucker in Milchsäure; diese reagiert auf das in der Milch vorhandene alkalische Phosphat und verwandelte es in saures Phosphat, und dieses seinerseits fällt das Kaseïn. *Hallier* schrieb den Prozefs den im Kälbermagen vorhandenen Bakterien zu.

Die Frage wurde schliefslich von *Hammarsten* entschieden. Er zeigte nicht nur, dafs das Tyrosin vom Kaseïn wesentlich verschieden war, sondern er wies auch nach, dafs die Gerinnung von der Gegenwart des Milchzuckers in der Milch ganz unabhängig war,

Digitized by Google

indem er in der bereits beschriebenen Weise eine Kaseïnlösung bereitete und beobachtete, dafs diese bei Gegenwart von Lab gerann. Bei seiner Methode der Darstellung des Kaseïns blieb der Milchzucker in der Mutterlauge zurück, aus der das Eiweifs gefällt worden war. *Hammarstens* reines Labenzym war ferner, wie er feststellte, ohne jegliche Einwirkung auf Milchzucker, während es Milch oder Kaseïnlösungen sehr schnell zum Gerinnen brachte.

Die Theorie von der Wirkung der Säure wird auch durch die Thatsache hinfällig, dafs die Gerinnung auch in schwach alkalischer Lösung vor sich geht.

Verschiedene Forscher haben gewisse Eigentümlichkeiten des aus dem Pankreassaft dargestellten Labenzyms beobachtet. Es wurde bereits erwähnt, dafs *Roberts* bei der Prüfung der proteolytischen Wirkung des Pankreassaftes oder Pankreasauszuges auf Milch eine eigentümliche Änderung der Eiweifskörper beobachtete die von der von Trypsin bewirkten gewöhnlichen Proteolyse verschieden zu sein schien. Setzte man Milch kurze Zeit der Wirkung des Pankreassaftes aus und kochte sie dann auf, so entstand beim Kochen ein Niederschlag von Kaseïn in quargartiger Form. *Roberts* schrieb diese Umwandlung der Wirkung des Trypsins zu. Spätere Forscher haben jedoch gefunden, dafs diese Wirkung auf das Labenzym zurückzuführen sei, das mit dem Trypsin in dem Pankreas ausgeschieden werde. Das Produkt unterscheidet sich von dem Tyreïn dadurch, dafs es sich bei gewöhnlicher Temperatur nicht als Quarg ausscheidet. *Roberts* nannte es Metakaseïn, welcher Name von späteren Forschern beibehalten wurde. Es kann aus Milch gewonnen werden, auf die man eine kleine Menge Pankreas-Lab einwirken läfst, wobei es auf Hinzufügen eines gleichen Volumens einer gesättigten Kochsalzlösung ausgefällt wird. Vom Kaseïn unterscheidet es sich wiederum dadurch, dafs es bei weiterer Einwirkung von Lab nicht gerinnt.

Unter den Bedingungen, unter denen das Metakaseïn gebildet wird, ist die wichtigste, dafs nur sehr wenig Labenzym genommen wird. Nur dann wird Metakaseïn anstatt Tyreïn gebildet. Das Nebenprodukt, das bereits erwähnte Molkeneiweifs, wird gleichzeitig mit dem Metakaseïn gebildet.

Digitized by Google

Halliburton und *Brodie* unterscheiden zwischen Magenlab und Pankreaslab, was bei früheren Forschern nicht der Fall war. Nach ihnen ist die durch Pankreaslab bewirkte Gerinnung keine wirkliche Koagulation, sondern eine Fällung, die in der Wärme bei 35—40° C. stattfindet. Der Niederschlag ist feinkörnig und kann mit bloſsem Auge nicht entdeckt werden. Beim Abkühlen auf Lufttemperatur setzt er sich als zusammenhängender Quarg ab, der aber wieder durch Erwärmen auf 35° C. zerstört werden kann, wobei die körnige Beschaffenheit wieder eintritt und die Milch wieder flüssig erscheint. Das kann man mehrere Male wiederholen. *Halliburton* und *Brodie* nennen das Eiweiſs in diesem Zustand „pankreatisches Eiweiſs" und behaupten, daſs es durch Magenlab in Tyreïn übergeführt werden könne.

Lab scheint in den Zellen von Magen- oder Pankreasdrüsen nicht in einem Zustand aufgespeichert zu sein, in dem es Koagulation bewirken kann, sondern es scheint eher in der Form eines Zymogens vorhanden zu sein. Dies ist durch *Hammarsten* und später von *Langley* bestätigt worden. Letzterer untersuchte die Magendrüsen von Hund, Katze, Kaninchen, Maulwurf und Frosch, ebenso die Schlunddrüsen des letzteren. Keine dieser Drüsen enthielt Lab, doch war das Zymogen in allen vorhanden. Das Zymogen kann, wie das des Trypsins oder Pepsins, durch 15 Minuten langes Erwärmen mit einer verdünnten Säure in das Enzym übergeführt werden. *Langley* fand, daſs das Zymogen, wie das Enzym selbst, bei einige Minuten langem Erwärmen auf 38° C. bei Gegenwart von 0,5—1,0 % Soda zerstört wird.

Auſser in den Drüsen von Säugetieren fand *Hammarsten* das Zymogen in den Magendrüsen gewisser Fische, hauptsächlich des Hechtes.

Pflanzenlab.

Das Vorkommen von Lab im Pflanzenreich ist seit dem 16. Jahrhundert bis auf den heutigen Tag von vielen Forschern beobachtet worden. *Linné* teilt mit, daſs man zu seiner Zeit bereits wuſste, daſs die Blätter von Pinguicula vulgaris die Milch koagulieren und daſs verschiedene Lappländer-Stämme, mit denen er in Berührung kam, sie hierzu benutzten. *Prior* spricht in seinen „Populären Namen Britischer Pflanzen" von einer merk-

Digitized by Google

würdigen Eigenschaft des Galium verum (Labkraut), die von *Matthioli* im sechszehnten Jahrhundert erwähnt wurde. der darüber schrieb: „Galium inde nomen sortitum est suum quod lac coagulet". (Das Labkraut hat daher seinen Namen, weil es Milch koaguliert.) In West Somersetshire und gewissen Teilen von Herefordshire kennt man diese Eigenschaft des Labkrautes noch und der Käser giebt die Pflanze gewöhnlich zur Milch, um den Quarg zur Käsefabrikation zu bereiten. Das wirksame Prinzip scheint in den Blüten enthalten zu sein, wenn auch die ganze Pflanze benutzt wird. Es ist einigermafsen auffällig, dafs unsere anderen einheimischen Galiumarten das Enzym nicht zu enthalten scheinen.

Viele andere Beobachtungen ähnlichen Charakters sind von verschiedenen Forschern gemacht worden. *Pfeffer* teilt mit, dafs Pinguicula vulgaris in den italienischen Alpen von der Landbevölkerung zur Bereitung von Quarg aus Milch benutzt wird. *Darwin* beobachtete, dafs die Ausscheidung der Drüsen von Drosera nicht nur Proteïde verdauten, sondern auch Milch zur Gerinnung brachten. Die Vergesellschaftung von Lab mit einem proteolytischen Enzym trifft man oft. *Baginsky* fand es im Saft der Melone (Carica Papaya), die wie wir sahen, besonders reich an pflanzlichem Trypsin ist. *Martin* bestätigte die Beobachtung *Baginskys* im Verlauf seiner von uns bereits besprochenen Versuche. *Chittenden* zeigte, dafs Lab neben Bromelin im Saft der Ananas vorkommt, jedoch mit einem anderen Proteïd vergesellschaftet ist.

Das Labenzym ist in einigen Pflanzen ganz sonderbar verteilt. Es findet sich im Bast der Stammbündel von Clematis Vitalba und in den Blütenblättern der Artischoke (Cynara scolymus); an beiden Stellen würde man für gewöhnlich nicht nach einem der beiden Enzyme suchen.

Am meisten scheint das pflanzliche Lab in den Früchten und Samen der Pflanzen vorzukommen; jedenfalls kann man es hier am ehesten auffinden. Es kommt häufiger in dem Samen als in der Frucht vor.

Ein sehr wirksames Labpräparat kann man aus dem Pericarp der gurkenartigen Frucht der merkwürdigen Pflanze „Naras" erhalten, die in den sehr trockenen Wüstenplätzen in Namaqua-Land und

Digitized by Google

der Walfisch-Bai in Südafrika wächst. Naras (Acanthosicyos horrida) ist eine typische kriechende Wüstenpflanze, von drahtartigem Aussehen und reich mit Dornen besetzt. Sie hat schuppenförmige Blätter, die sehr schnell abfallen; sie haften am Stamm und sind eng daran angeschmiegt, so dafs die Pflanze aus einiger Entfernung blattlos aussieht. Jedes hat an der Basis zwei scharfe Dornen, die nicht abfallen. Die Blüten entwickeln sich ohne Stengel zwischen diesen Dornen und daher in den Axen der häufig abortiven Blätter. Die Frucht ist ein fast kugelförmiger Kürbis mit einer harten zähen Haut und einem sehr angenehmen sauren Fruchtfleisch, welches dem der Orange ähnelt und in dem zahlreiche Samen eingebettet sind. Obgleich das Fleisch sehr schmackhaft ist, so werden doch Fremde, die es essen, oft sonderbar davon mitgenommen. Es soll ein fast unerträgliches Jucken im After verursachen. Das Labenzym ist beschränkt auf die saftigen Teile der Frucht, die Samen sind fast frei davon. Das Enzym wird durch Trocknen nicht zerstört, sondern kann fast unbegrenzt durch Trocknen des Fruchtfleisches konserviert werden. Wie andere Enzyme wird es durch Kochen zerstört. Nach *Marloth* ist es löslich in 60prozentigem Alkohol. Es wird nur in der reifenden Frucht entwickelt.

In Samen scheint das Labenzym sehr häufig vorzukommen. Aus diesen wurde es zuerst dargestellt von *Lea*, der es in den ruhenden Samen von Withania coagulans fand, einem zu den Solaneen gehörigen Strauch, der in Afghanistan und dem nördlichen Indien wild wächst. Withania hat eine Kapselfrucht, die eine grofse Anzahl kleiner Samen von dunkelbrauner Farbe enthält. Das Labenzym kann aus den gemahlenen Samen mittelst Glycerin oder mit einer mäfsig starken Kochsalzlösung ausgezogen werden. Es ist jedoch noch sehr verunreinigt durch den Farbstoff der Samenschale, der sich in der Extraktionsflüssigkeit mit dunkelbrauner Farbe löst. Seine Wirksamkeit ist fast dieselbe, wie die des tierischen Labes des Handels, und in seinem Einzelverhalten unterscheidet es sich von diesem gar nicht. Es wird in ähnlicher Weise durch die Temperatur beeinflufst, doch kann es ziemlich lange mit Alkohol in Berührung sein, ohne zerstört zu werden.

Der Verfasser hat in den Samen von Datura Stramonium Pisum sativum, Lupinus hirsutus und Ricinus communis

Digitized by Google

Lab angetroffen; bei den beiden ersten im ruhenden, bei den beiden letzten im keimenden Samen. Obwohl es bei Ricinus nicht im ruhenden Samen vorkommt, so enthält doch der Samen ein Zymogen, das in Wasser löslich ist und leicht beim Erwärmen mit verdünnter Säure die Fähigkeit erlangt, Milch zur Gerinnung zu bringen. Das Labenzym selbst kann aus dem keimenden Samen durch Salzlösung oder Glycerin extrahiert werden. Es kommt im Endosperm vor, eng vergesellschaftet mit Lipase und Trypsin. Es ist oft in beträchtlicher Menge vorhanden, oder aber es mufs sehr energische Eigenschaften besitzen; bei einem Versuch koagulierte ein Glycerinauszug das zweieinhalbfache Volumen Milch in fünf Minuten. Der Salzauszug wirkt langsamer als der Glycerinauszug, da Kochsalz, ebenso wie beim Trypsin, die Wirkung des Labenzyms hindert. Verschiedene Samen jedoch enthalten sehr wechselnde Mengen des Enzyms.

Ricinuslab kann in saurer, neutraler und alkalischer Lösung arbeiten. Ein zu grofser Säuregehalt hemmt die Wirkung, da die Säure selbst das Kaseïn aus der Milch ausfällt.

Im keimenden Lupinensamen kommt Lab neben Trypsin vor, doch in viel geringerer Menge.

Das Enzym kommt auch noch in manchen niederen Pflanzen vor. *Duclaux* hat nachgewiesen, dafs es von mehreren Fadenpilzen erzeugt wird und dafs es viele Mikroorganismen ausscheiden. Die von *Wood* geprüften Bazillen, die, wie wir sahen, proteolytische Enzyme liefern, enthalten auch Labenzym. Dafs in den Ausscheidungen dieser Pflanzen zwei Enzyme enthalten sind, zeigt sich an dem verschiedenen Verhalten gegen zerstörende Einflüsse. Läfst man allmählich wachsende Mengen Mineral- oder organische Säuren darauf einwirken, so verschwindet das Peptonisationsvermögen vor der Zerstörung des Labenzyms, während bei Anwendung von Karbolsäure das Umgekehrte der Fall ist. *Vignal* zeigte das Vorkommen des Labenzyms im Bacillus mesentericus vulgatus neben vier anderen Enzymen. *Conn* trennte das Labenzym aus dem proteolytischen Enzym dieser Bazillen nach einer den schon beschriebenen Methoden ähnlichen Methode. Er vermischte die Sekretion der Mikroben mit Milch und liefs diese koagulieren. Der Quarg wurde dann

Digitized by Google

zerkleinert, mit Wasser gewaschen und das Ganze durch Thonplatten filtriert. Schwefelsäure wurde bis zur Menge von 0,1 % zugesetzt und dann die Flüssigkeit mit Kochsalz gesättigt. Ein weifser körniger Schaum trat an die Oberfläche, der sich als fast reines Labenzym erwies; das proteolytische Enzym war in der Salzlösung geblieben. *Conn* fand, dafs das Labenzym in reicher Menge von den Mikroben bei der Kultur des Bacillus bei 20° C. gebildet wird, während das proteolytische Enzym bei einer Temperatur von 35° C. die Oberhand gewann.

Die Wirkung des Labes ist wahrscheinlich eine proteolytische, doch weifs man hierüber noch fast gar nichts genaueres. Dafs es das Kaseïn spaltet, erscheint durch das gleichzeitige Auftreten des Molkeneiweifses und des Tyreïns wahrscheinlich. Keiner dieser beiden Körper kommt jedoch bei der Proteolyse mittelst Pepsin oder Trypsin vor; die Beziehungen dieser beiden Enzymgruppen müssen daher fürs erste noch offen gelassen werden. Man weifs augenblicklich überhaupt noch nichts über die Rolle, die das Labenzym im pflanzlichen Stoffwechsel spielt. Sein konstantes Vorkommen im Magen junger Tiere, deren Hauptnahrung in Milch besteht, scheint darauf hinzudeuten, dafs es bei der ersten Verdauung des Eiweifses in Betracht kommt; warum jedoch die Gerinnung mittelst Lab in diesem Falle dienlicher sein sollte, als eine Fällung des Kaseïns durch die Säure des Magensaftes, ist noch nicht klar. Es mag jedoch sein, dafs die Verbindung der Eiweifsstoffe mit kleinen Mengen freier Säure, die im Magen stattfindet, die Säurefällung so lange hinausschiebt, bis ein gewisser Teil der unveränderten Milch ihren Weg aus dem Magen in den Darm gefunden hat.

Digitized by Google

Kapitel XVI.

Die Gerinnungsenzyme (Fortsetzung), **Thrombase (Thrombin), das Fibrinenzym.**

Es ist bekannt, dafs das Blut der Säugetiere, frisch dem Tier entnommen, gerinnt. Das aus einer Arterie strömende Blut ist anfangs vollkommen leichtflüssig. Nachdem es ein bis zwei Minuten mit den Wandungen des Sammelgefäfses in Berührung war, wird es zähe und verwandelt sich allmählich in eine feste Gallerte. Nach einigen Stunden schwitzt aus der Oberfläche eine Flüssigkeit in Tropfenform aus, nimmt allmählich an Menge zu, bis die Gallerte, die nun noch fester geworden ist, in einer beträchtlichen Menge Flüssigkeit herumschwimmt. Dieses Ausschwitzen der Flüssigkeit, die den Namen Serum führt, rührt von dem Schrumpfen eines Blutbestandteiles her, wodurch der flüssige Bestandteil gewissermafsen herausgeprefst wird und ein fester Gerinnselkuchen von lederartiger Beschaffenheit verbleibt. Der Kuchen ist tiefrot, denn er enthält die roten Blutkörperchen, die darin infolge des schnellen Verlaufes der Umwandlung mechanisch verteilt sind.

Man vermutete ursprünglich, dafs die Gerinnung des Blutes darauf zurückzuführen sei, dafs die Blutkörperchen sich mechanisch verbänden, die, wie man beobachten kann, in einander laufen und eine Rolle bilden, wenn man einen Tropfen Blut unter dem Mikroskop mit Wasser oder Kochsalzlösung verdünnt. *Hewson* zeigte zuerst im Jahre 1772, dafs der Prozefs unabhängig von den roten Blutkörperchen vor sich geht und auf die Ausscheidung eines besonderen, faserig aussehenden Körpers aus dem Plasma oder dem Liquor sanguinis zurückzuführen ist. Diese Substanz führt jetzt den Namen Fibrin; man weifs, dafs die Koagulation durch die Bildung des Fibrins aus einer anderen im Blut ent-

Digitized by Google

haltenen Substanz bewirkt wird. Die Trennung dieser Muttersubstanz des Fibrins versuchte im Jahre 1859 *Denis*. Er sättigte das Blut mit Kochsalz und erhielt einen stückigen Niederschlag eiweiſsartiger Natur. Wurde dieser von der Flüssigkeit getrennt und in einer verdünnten Lösung desselben Salzes wieder gelöst, so koagulierte die Lösung ebenso wie normales Blut. *Denis* nannte den ausgefällten eiweiſsartigen Stoff Plasmin. Etwas später zeigte *Schmidt*, daſs gewisse seröse Flüssigkeiten, die nicht freiwillig gerinnen, durch Zusatz von etwas Serum zum Gerinnen gebracht werden können. Aus einer dieser Flüssigkeiten, einer Wasserbruchflüssigkeit, stellte er nach *Denis*' Methode ein Eiweiſs dar, das er Fibrinogen nannte. Das Serum, das in der Wasserbruchflüssigkeit Koagulation bewirkt, liefert, wenn in ähnlicher Weise gesättigt, ein anderes Eiweiſs. *Schmidt* nannte dieses Fibrino-Plastin. Weder Serum noch Wasserbruchflüssigkeit gerinnt freiwillig, noch kann man derartige Niederschläge aus ihnen gewinnen. Die gemischten Flüssigkeiten oder ein Gemisch der Lösungen der mit Salz ausgefällten Niederschläge liefern jedoch ein richtiges Koagulum. *Schmidt* fand, daſs die Gerinnung von einem dritten Faktor abhängig sei, der bei seinem Fibrino-Plastin zutraf, das er durch Sättigen von Blut mit Salz dargestellt hatte. Stellte man dieses Proteïd durch Durchleiten eines Kohlensäurestromes durch beträchtlich verdünntes Serum dar, so veranlaſste seine Lösung beim Hinzufügen zu einer Fibrinogenlösung nicht immer Gerinnung. *Schmidt* ist der Ansicht, daſs dieser dritte Körper zur Einleitung der Reaktion oder zur Vereinigung der beiden ersten Körper nötig sei. Er suchte danach im Serum und stellte ihn im Jahre 1872 in rohem Zustande durch Fällen der Eiweiſsstoffe des Serums mittelst eines groſsen Überschusses von Alkohol dar. Den Niederschlag lieſs er so lange unter Alkohol stehen, bis die Proteïde fast gänzlich unlöslich geworden waren; dann trennte er ihn durch Dekantation oder Filtration und trocknete ihn. Ein wässeriger Auszug aus dem so bereiteten Pulver rief in seinen Fibrinogenlösungen, die nicht spontan geronnen, Gerinnung hervor. *Schmidt* gab diesem dritten Faktor den Namen Fibrin-Ferment. Sein Fibrino-Plastin nannte er in der Folge Paraglobulin oder Serumglobulin, da seine Reaktionen ergaben, daſs es wie das Fibrinogen ein Glied der

Digitized by Google

Globulinklasse der Eiweifsstoffe war. *Schmidt* erklärte die Koagulation mit der Annahme, dafs diese beiden Globuline unter dem Einflufs des Fibrin-Fermentes unter Bildung von Fibrin in Wechselwirkung treten.

Einige Jahre später zeigte *Hammarsten*, dafs die Gegenwart von Serumglobulin zur Bildung des Fibrins nicht nötig sei, sondern dafs es bei dem Prozefs durch andere Substanzen ersetzt werden könne, z. B. durch Chlorcalcium und unreines Kaseïn. Serumglobulin selbst ist in reinem Zustand ohne Wirkung. Er kam daher zu dem Schlufs, dafs die Bildung des Fibrins auf die Wirkung des Fibrinenzyms auf Fibrinogen allein zurückzuführen sei, und zwar unter gewissen günstigen Bedingungen, die gewöhnlich bei Gegenwart von Serumglobulin zutreffen.

Die Koagulation des Blutes ist sonach ein enzymatischer Prozefs; das „Fibrinferment" ist innerhalb der letzten 20 Jahre der Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Sein ganzes Verhalten deutet darauf hin, dafs es zur grofsen Gruppe der Enzyme gehört und dafs es dem Lab näher steht, als irgend einem anderen der bislang bekannten Enzyme. Es zeigt dasselbe Verhältnis gegen Temperaturerhöhungen wie die anderen Enzyme; es wirkt sehr schwach bei sehr niedriger Temperatur, von da ab wächst seine Kraft bis zur Temperatur von 38—40° C., wo es am stärksten wirkt, und es wird getötet bei etwa 50° C. Es erleidet bei seiner Vereinigung mit Fibrinogen keine Verminderung und wird während seiner Thätigkeit nicht zerstört. Die Zersetzung, die es bewirkt, ist nicht genau erforscht, doch scheint es sich wie das Labenzym zu verhalten, indem es das Fibrinogen unter Bildung eines unlöslichen Eiweifsstoffes, des Fibrins, und eines löslichen von Globulincharakter zersetzt, welcher letztere in Lösung bleibt. Diese Art der Zersetzung erinnert an die Bildung von Tyreïn und Molkeneiweifs.

Das „Fibrinferment", das neuerdings den Namen »Thrombase« oder Thrombin erhalten hat, wurde zuerst von *Alexander Schmidt* aus fibrinfreiem Blut oder aus dem Serum, das sich aus normal geronnenem Blut ausscheidet, dargestellt. Das ist jedoch nicht die einzige Quelle, sondern es kann noch leichter und in noch bedeutenderer Menge aus dem gebildeten Fibrin erhalten werden. Dies entdeckte zuerst im Jahre 1835 *Buchanan*,

Digitized by Google

der fand, dafs sowohl Wassersack- als auch Herzbeutelflüssigkeiten, die nicht spontan koagulieren, nach Zusatz von etwas Fibrin gerinnen. *Buchanan* verdünnte Blut mit einer beträchtlichen Menge Wasser, wodurch er den Koagulationsprozefs hinausschob und den sich schliefslich bildenden Fibrinniederschlag in loserer Form erhielt. Das Fibrin konnte aus dem Blut sofort nach seiner Bildung durch Schlagen mit einem Zweigbündel entfernt werden, an dem das Fibrin hängen blieb. *Buchanan* nannte sein Präparat „gewaschenen Blutkuchen". Viele Jahre später gab *Gamgee* an dafs der „gewaschene Blutkuchen" bei der Extraktion mit etwa 8prozentiger Salzlösung ein sehr wirksames Enzym abgab. In der Folge zeigten andere Forscher, dafs normales Fibrin, welches aus unverdünntem Blut erhalten worden war, ebenfalls einen sehr wirksamen Auszug lieferte. Die Thrombase kann somit aus dem Fibrin des Blutgerinnsels oder aus dem aus dem Gerinsel beim Stehen sich abscheidenden Serum gewonnen werden.

Die Thrombase kommt im normalen Blut vor dessen Koagulation nicht vor. Wird das Blut aus der Ader oder der Arterie direkt in Alkohol gelassen und dann ebenso behandelt, wie dies *Schmidt* mit seinem Serum oder mit fibrinfreiem Blute that, so bewirkt die Lösung oder der Auszug der gefällten Eiweifsstoffe keine Koagulation seröser Flüssigkeiten. Die Thrombase scheint erst mit der Koagulation aufzutreten. *Schmidt* beobachtete, dafs gerade in diesem Augenblick eine Zersetzung der farblosen Blutkörperchen oder Leukocyten stattfindet, und schliefst hieraus, dafs aus dieser Zersetzung das Enzym hervorgehe. Diese Ansicht wird durch eine frühere Beobachtung von *Buchanan* unterstützt, dafs, wenn die Koagulation des Blutes so lange verzögert wird, bis die roten Blutkörperchen zu Boden gegangen sind, das oben schwimmende Plasma einen wirksameren „gewaschenen Blutkuchen" liefert als das übrige Blut. Dieses Plasma enthält die gröfste Menge der Leukocyten, die viel langsamer als die roten Blutkörperchen zu Boden gehen. Er schlofs daraus, dafs die Wirksamkeit des „gewaschenen Blutkuchens" in Bezug auf die Koagulation von seinen Zellelementen abhängig sei.

Die Natur der auf dem doppelten Weg erhaltenen beiden „Fibrinfermente" scheint auf den ersten Blick nicht die gleiche zu sein. Nach *Schmidts* Methode dargestellt, scheint seine Eiweifs-

Digitized by Google

natur nicht aufser Zweifel, da alle von ihm benutzten Bluteiweifsstoffe bei längerer Einwirkung von Alkohol koagulieren und unlöslich werden. Das aus dem Fibrin gewonnene Enzym scheint eher zur Klasse der Globuline zu gehören; das sind in Wasser unlösliche, in Kochsalz- und anderen neutralen Salzlösungen lösliche Proteïde. Es ist jedoch mehr Grund zur Annahme, dafs der Unterschied mehr ein scheinbarer als wirklicher ist, denn *Schmidt* giebt an, er habe sein Enzym nie frei von Eiweifs erhalten, und er fand, dafs es am wirksamsten war, wenn die Menge des Eiweifses am gröfsten war. Man kann unschwer annehmen, dafs seine Proteïde durch Alkohol nicht vollständig unlöslich gemacht wurden. Er giebt vielmehr an, dafs es ihm nie gelungen ist, sein Fibrino-Plastin (Serum-Globulin) frei von Enzym zu erhalten.

Diese Betrachtungen führten die meisten Beobachter zu der Annahme, dafs das Enzym proteïdartiger Natur und mit dem Serumglobulin eng vergesellschaftet sei.

Andererseits werden die Globuline stets beim Kochen koaguliert. Die Koagulation eines Eiweifses in der Hitze darf nicht mit der Koagulation des Blutes oder der Milch verwechselt werden, da sie nur den Übergang eines Eiweifsstoffes in eine besondere unlösliche Form darstellt und nicht die Bildung eines Gerinnsels. Unglücklicherweise führen beide verschiedene Vorgänge denselben Namen. Wenn man ein Albumin oder Glubolin in Lösung auf etwa 70° C. erhitzt, so wird es in die in Frage stehende unlösliche Form übergeführt, die man als koaguliertes Eiweifs kennt. *Schmidt* giebt an, dafs wässerige Lösungen seines Enzyms beim Kochen dieses Eiweifs nicht abschieden, obgleich die spezifische Wirkung des Enzyms bei einer Temperatur von 70° C. zerstört wurde. Die gleiche Beobachtung machte *Sheridan Lea* gemeinsam mit dem Verfasser gelegentlich ihrer Versuche zur Darstellung der Thrombase aus Fibrin.

Die Ansicht, dafs das Enzym ein Eiweifsstoff sei, wurde von *Halliburton* scharf vertreten, der es aus den Leukocyten der Lymphdrüsen darstellte. Er brachte es mit einem besonderen Eiweifsstoff in Verbindung, der dem Serumglobulin sehr ähnelte, sich in einigen Einzelheiten von diesem jedoch unterschied, z. B. in der Koagulationstemperatur. Beim Erhitzen in 5—10prozent.

Digitized by Google

Kochsalzlösung geht die Koagulation bei 60—61 ° vor sich, während Serum-Globulin unter 75° C. nicht verändert wird. *Halliburton* nannte dieses Eiweifs ursprünglich „Zellglobulin".

Die Wahrscheinlichkeit, dafs das Serumglobulin und das Enzym verschieden sind, findet eine Bestätigung durch *Hammarsten*, der aus Wasserbruchflüssigkeit, die nicht spontan koaguliert, ein reines Globulin erhielt (Serum-Globulin), das frei von Enzym war und keine fibrinoplastischen Eigenschaften aufwies.

In dem aus normal geronnenem Blut erhaltenen Serum finden sich diese beiden Globuline nebeneinander, was bis zu *Halliburtons* Untersuchungen nicht bekannt war.

Weiter bezweifelte *Halliburton*, dafs sein Zellglobulin ein wirkliches Eiweifs sei, da es bei der Magenverdauung einen Nukleïnrückstand, einen phosphorhaltigen Körper, hinterläfst. In seiner neuesten Arbeit fügt er es in eine Gruppe von Körpern ein, die den Proteïden verwandt sind und den Namen Nukleo-Albumine führen. *Pekelharing* kam unabhängig hiervon zu derselben Ansicht. *Halliburton* giebt ferner an, dafs die nach *Schmidts* Verfahren dargestellte Thrombase Reaktionen giebt, die darthun, dafs sie zu dieser Gruppe gehört. Die Thrombase ist also ein Nukleo-Albumin, oder ist doch mit einem solchen Körper eng vergesellschaftet.

Die Koagulation des Blutes ist jedoch ein viel komplizierterer Prozefs, als man nach dem bislang Gesagten anzunehmen geneigt sein könnte. Es steht fest, dafs sie auf mannigfache Weise verzögert oder gar verhindert werden kann; z. B. kann sie beträchtlich verzögert werden, wenn man das Blut bei sehr niederer Temperatur hält; in dieser Beziehung ist das Pferdeblut besonders empfindlich. Mischt man das Blut sofort nach dem Ausfliefsen mit starken Salzlösungen, so bleibt es auf sehr lange Zeit flüssig; am wirksamsten sind in dieser Beziehung Natrium- und Magnesiumsulfat. Bei langsamer Verdünnung, wobei die Salzlösung auch verdünnt wird, tritt allmählich Gerinnung ein. Wenn man in die Adern eines vorher mit Chloroform narkotisierten Hundes eine gewisse Menge Handelspepton, das reichliche Mengen Albumosen enthält, einführt und dann dem Tier das Blut entzieht, so bleibt es unbegrenzt lange flüssig. In einigen Fällen erreichte man dasselbe, wenn man dem eben abgelassenen Blut das Pepton zusetzte. Wenn man einen Auszug aus dem Kopf und Schlund

Digitized by Google

des gewöhnlichen Blutegels mit abgelassenem Blut mischt, so gerinnt dieses nicht. Dieser Auszug enthält eine besondere Albumose. Andere Methoden, nach denen das Blut flüssig erhalten werden kann, werden wir weiter unten noch besprechen.

Das nach diesen Methoden flüssig erhaltene Blut liefert Plasmata, die nicht freiwillig koagulieren, die jedoch durch eine besondere Behandlungsweise zur Gerinnung gebracht werden können. Sie werden gewöhnlich als „gesalzenes Plasma", „Pepton-Plasma", „Blutegelauszug-Plasma" bezeichnet.

Man mufs auch noch den Einflufs der in der Blutflüssigkeit enthaltenen organischen Salze beim Studium des Koagulationsvorganges in Betracht ziehen. Dialysiert man das nach irgend einer der bekannten Methoden flüssig erhaltene Blut so lange, bis es ganz salzfrei ist, so kann es nicht zur Koagulation gebracht werden. Von allen im Plasma vorhandenen Salzen erheischen die Kalksalze am meisten Beachtung. *Brücke* zeigte zuerst, dafs die Asche des Fibrins stets eine Calciumverbindung enthält. Der Verfasser fand im Jahre 1884, dafs das aus gepeitschtem Blut gewonnene Fibrin stets etwas Gyps enthält, der auf passende Weise entfernt werden kann. Wie bereits erwähnt, zeigte *Hammarsten*, dafs Chlorcalcium zur Unterstützung der Thrombase die Stelle des Paraglobulins vertreten kann.

Der Verfasser fand im Jahre 1885, dafs die Koagulation eines „gesalzenen Plasmas", die durch Verdünnen um eine Stunde verzögert worden war, nach Zusatz einiger Tropfen Gypslösung sofort stattfand. Das „gesalzene Plasma" enthielt natürlich etwas Enzym, dessen Wirkung durch das benutzte Magnesiumsulfat zeitweilig gehemmt worden war. Ein Zusatz von Gyps zu einer enzymfreien serösen Flüssigkeit, z. B. Wasserbruchflüssigkeit, verursachte keine Koagulation.

Der Schlufs lag nahe, dafs in irgend einer Beziehung die Wirkung der Thrombase von einem Kalksalz, vielleicht von Gyps abhängig sei.

Dieser Schlufs wurde noch durch folgenden Versuch unterstützt:

Man befreite Pferdeblut durch lange andauernde Dialyse in von Eis umgebenen Röhren von seinen Salzen. Hält man Pferdeblut bei 0°, so kann die Koagulation, wie bereits erwähnt, unbegrenzt hintangehalten werden.

Digitized by Google

Nach langer Dialyse waren alle Salze aus dem Blut entfernt, bis auf das Kochsalz, das notwendig ist, um die Globuline vor dem Ausfallen zu behüten. Man sorgte daher dafür, dafs im Blut stets 0,6 % des Salzes vorhanden waren. Das Plasma wurde alsdann vom Eis heruntergenommen und auf Körpertemperatur gebracht; es koagulierte nicht, weder verdünnt, noch unverdünnt. Nach Zusatz von etwas Gypslösung trat die Gerinnung rasch ein. Eine Fällung des Gypses im Blut mit Chlorbaryum hemmte die Koagulation wesentlich, hinderte sie jedoch nicht ganz. Aus diesen Versuchen ging hervor, dafs wahrscheinlich der Gyps ein für den Vorgang notwendiger Faktor sei. Seine Entfernung mit Chlorbaryum war keine vollständige.

Im Jahre 1888 entdeckten *Arthus* und *Pagès*, dafs man die Koagulation fast völlig hindern kann, wenn man das Blut mit einer 0,2 prozentigen Lösung von oxalsaurem Kalium mischt. Dieses Salz bildet mit den Kalksalzen einen unlöslichen Niederschlag und entfernt fast alles Calcium aus der Flüssigkeit. Es ist dies das beste Fällungsmittel, da kein anderes den Kalk so vollständig entfernt.

Schäfer stellte fest, dafs selbst mit Oxalsäure versetztes Plasma langsam koagulierte, so dafs selbst die Ausfällung des gröfseren Teiles des Calciums nicht seine Reaktion mit dem Fibrinogen gänzlich hinderte.

Andere Forscher, insbesondere *Ringer*, fanden, dafs andere Kalksalze aufser dem Gyps in „gesalzenem Plasma“ ebenfalls Koagulation bewirken, z. B. das Chorid und das Phosphat. Keines von beiden wirkt jedoch so schnell wie der Gyps. Ob dieser der thatsächlich wirksame Körper ist, diese Frage mufs zur Zeit noch offen gelassen werden; es ist dies aber nicht unmöglich, denn das Blut enthält Sulfate anderer Metalle, die zur Bildung von Gyps Veranlassung geben, wenn man ein anderes lösliches Kalksalz hinzufügt. Es mag auch im Zusammenhang hiermit an das Vorkommen von Gyps im Fibrin erinnert werden.

Die Theorie von der Gerinnung mufs im Lichte dieser Thatsachen erweitert werden. Die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin findet nur unter der Einwirkung gewisser Kalksalze statt.

Die Rolle, die das Kalksalz hierbei spielt, ist zur Zeit noch nicht aufgeklärt. Wenn man bedenkt, dafs Calcium sich stets in

Digitized by Google

der Fibrinasche vorfindet, so erscheint es auf den ersten Blick möglich, dafs das Fibrin aus der Verbindung irgend eines Kalksalzes mit dem Fibrinogen besteht und dafs die Thrombase diese Vereinigung zuwege bringt. Der Versuch und die Analyse verneinen jedoch diese Annahme; bei Gegenwart einer beträchtlichen Fibrinogenmenge in einer Lösung wechselt das Gewicht des gebildeten Fibrins nicht mit der Menge des zugeführten Kalksalzes. Eine sehr kleine Menge desselben bewirkt Koagulation, eine gröfsere Menge bewirkt keine stärkere Koagulation. *Hammarsten* hat kürzlich gezeigt, dafs sowohl Fibrinogen als auch Fibrin die gleiche Calciummenge enthalten, so dafs letzteres nicht eine Kalkverbindung des ersteren sein kann.

Aus den bereits erwähnten Versuchen kam der Verfasser zu der Ansicht, dafs die Thrombase im Blut in der Form eines Zymogens enthalten sei, und dafs dieses unter dem Einflufs des Kalksalzes in ein wirksames Enzym umgewandelt werde. Es gelang ihm jedoch nicht, diese Annahme zu beweisen. Neuerdings sprach *Pekelharing* dieselbe Ansicht aus, dem es auch gelang, durch einige Versuche einen Beweis für diese Anschauung zu erbringen. Er stellte aus verschiedenen Formen extravasculären Plasmas eine Substanz ohne fibrino-plastischen Eigenschaften dar, die jedoch nach Behandlung mit einem Kalksalz die Fähigkeit erlangte, in Fibrinogenlösungen Koagulation zu bewirken. Diese Substanz scheint mit *Hammarstens* sogenanntem „Zellglobulin" identisch zu sein, das in Wirklichkeit ein Nucleo-Albumin ist, wie wir bereits dargelegt haben. *Hammarsten* hat auch den Nachweis erbracht, dafs das Nucleo-Albumin aus dem Plasma dargestellt werden kann, und dafs es nicht eher als Enzym wirkt, als bis es mit irgend einem löslichen Kalksalz behandelt wurde. *Pekelharing* vermutete, dafs die Zwischenwirkung des Calciumsalzes auf das Nucleo-Albumin-Zymogen, das er Prothrombin nannte, in der That in einer Vereinigung beider besteht; diese Ansicht hat aber bei den Physiologen bis jetzt wenig Aufnahme gefunden.

Die Thrombase besitzt also die Eigenschaften eines Enzyms. Sie ist, ebenso wie die anderen bislang besprochenen Enzyme, in ihrer Wirkung von der Temperatur abhängig. Eine sehr kleine Menge des Enzyms ruft in einer sehr grofsen Menge Blut Ge-

Digitized by Google

rinnung hervor; die Zeit, die hierzu nötig ist, steht etwa in dem umgekehrten Verhältnis zu seiner Menge. Es kommt im lebenden Körper im Zustande eines Zymogens vor; es verhält sich jedoch etwas eigentümlich bei seiner Umwandlung in das Enzym, da zu dieser Umwandlung ein Kalksalz nötig ist. Warum beide Körper in den lebenden Blutgefäfsen nicht aufeinander wirken, ist noch nicht in zufriedenstellender Weise aufgeklärt.

Die Thrombase verhält sich in verschiedener Beziehung absonderlich. Sie ist sehr empfindlich gegen neutrale Salze. Ihre Wirkung wird verhindert durch Magnesium- und Natriumsulfat und, in etwas geringerem Mafse, durch Kochsalz. Die Koagulation wird fast ganz gehemmt durch lösliche Oxalate, auf der anderen Seite wird sie aber ganz wesentlich gefördert durch die Anwesenheit von Kalksalzen, besonders von Gyps; in der That ist die Wirkung des Enzyms nur in deren Gegenwart möglich. Ob diese Salze die Bildung der Thrombase aus dem Enzym bewirken, oder ob sie nur ihre Wirksamkeit beeinflussen, ist noch nicht aufgeklärt. Wir haben Grund zur Annahme, dafs die Kalksalze eher bei der Bildung, als bei der Wirkung des Enzyms ihre Rolle spielen.

Nach *Dastre* wirkt die Thrombase am besten in neutraler Lösung. Er giebt an, dafs beim Arbeiten mit irgend einem künstlichen Plasma die Neutralisation stets die Koagulation beschleunigt. *Hammarsten* fand, dafs manche seröse Ausschwitzungen, die nicht spontan gerannen, nach erfolgter Neutralisation zur Gerinnung kamen.

Die Wirkung der Thrombase wird durch gewisse organische Körper gehindert, unter denen Albumosen und Peptone obenanstehen. Auch die Ausscheidung der Munddrüsen des Blutegels verhindern ihre Wirkung.

Die Ursache des hindernden Einflusses ist bei einigen dieser Körper festgestellt. Die löslichen Oxalate bilden mit dem Calcium eine unlösliche Verbindung und entziehen somit dieses Metall zum gröfsten Teil der Flüssigkeit. *Schäfer* zeigte, dafs hierdurch nicht in allen Fällen die schliefsliche Koagulation des Plasma gehindert wird. Es werden aber auch nicht die ganzen Kalkverbindungen entfernt. Mischt man die Lösungen zweier Salze, die ihre Metalle gegeneinander austauschen können, so ist die

Digitized by Google

Umsetzung niemals vollständig, sondern sie geht bis zu dem Punkt, bei welchem das dynamische Gleichgewicht für alle vier möglichen Verbindungen erreicht ist. Dieser Punkt wechselt mit der relativen Menge der ursprünglich auf einander reagierenden Körper; die Umsetzung ist jedoch nie vollständig, wenn nicht einer der neu gebildeten Körper so schnell als möglich, gleich nach seiner Bildung, entfernt wird. Daher bleibt auch beim Hinzufügen selbst eines Überschusses von oxalsaurem Kali etwas Kalksalz in Lösung. Das stimmt mit *Schäfers* Beobachtung, dafs das Eintreten der Koagulation wesentlich verzögert, jedoch nicht gänzlich gehindert wird.

Die Wirkung des Peptones oder Blutegel-Auszuges wird von einigen Physiologen als ein ähnlicher Vorgang betrachtet. Sie nehmen an, dafs diese Körper mit den Kalksalzen eine Verbindung eingehen und so die Bildung des Enzyms verhindern. Es ist bemerkenswert, dafs durch Hindurchleiten eines Stromes Kohlensäure durch eine Peptonplasma-Lösung, die an sich nicht gerinnt, die Gerinnung bald bewirkt wird. Die Kohlensäure scheint die Kalksalz-Pepton-Verbindung zu spalten und so die zum Gerinnen nötigen Bedingungen wiederherzustellen. Wenn man der Pepton-Plasmalösung noch weiter Kalksalz zufügt, so findet ebenfalls Koagulation statt.

Andere Physiologen behaupten, jedoch mit weniger Wahrscheinlichkeit, dafs das Pepton oder die Albumose das Enzym gänzlich zerstören. *Dickinson* behauptet, dafs dies auch zweifellos die Wirkung des Blutegelauszuges sein.

Zur Zeit ist es unmöglich, den hemmenden Einflufs des Magnesium- und Natriumsulfates zu erklären. Es erscheint wahrscheinlich, dafs diese Salze in gewisser Beziehung zum Enzym, aber nicht zu dem Calciumsalz stehen. Kochsalz im Überschufs wirkt vermutlich wie die Oxalate, doch viel weniger vollständig, da Chlorcalcium löslich ist.

Eine weitere Bedingung, die die Wirkung der Thrombase erheischt, ist die, dafs das Blut aus dem Körper entfernt sein mufs. Das Blut in den lebenden Gefäfsen oder die Gefäfse selbst zerstören das Enzym entweder oder hindern seine Wirkung. Die meisten Forscher fanden, dafs die Injektion eines wirksamen Enzymauszuges in die Venen eines lebenden Tieres kein Ge-

Digitized by Google

rinnen des Blutes innerhalb der Gefäſse bewirkt, selbst bei Anwendung beträchtlicher Mengen und wenn gleichzeitig lösliche Kalksalze mit eingeführt werden. *Halliburton* giebt an, daſs bei Einführung sehr groſser Mengen Thrombase in die Gefäſse das Blut nach erfolgter Entziehung schneller koaguliert, als normales Blut. Es scheint daher, als ob das Enzym bei seiner Einführung in den Körper zerstört wird. Eine derartige Zerstörung kann übrigens normalerweise im Blut stattfinden. Wir sahen bereits, daſs eine Quelle des Enzyms die Leukocyten des Blutes sind oder die Lymphe. *Schmidt* war der Ansicht, daſs das Enzym bei der Zersetzung dieser Leukocyten, die sich bei der Entziehung des Blutes abspielt, gebildet werde. Da diese Zellen fortwährend im lebenden Körper zersetzt werden, so müssen wir annehmen, daſs sie unter diesen Umständen keine Thrombase bilden oder daſs diese sofort nach der Bildung wieder zerstört wird, oder daſs das lebende Blut oder die Gefäſse, in denen es flieſst, die Einwirkung des Enzyms auf Fibrinogen verhindern. Das Ausbleiben der Koagulation kann nicht auf das Fehlen eines Kalksalzes zurückgeführt werden, denn das bloſse Entziehen des Blutes kann die darin enthaltene Menge Kalksalze nicht vermehren. *Schmidts* Beobachtung, daſs beim Einlaufenlassen von normalem Blut in Alkohol kein Enzym aus dem Niederschlag extrahiert werden kann, legt die Vermutung nahe, daſs eine wirkliche Zerstörung der Thrombase in den Blutgefäſsen stattfindet.

Die Einwirkung der Thrombase auf Fibrinogen kann mit der des Labs auf Kaseïn verglichen werden. In beiden Fällen beobachten wir die Bildung eines ganz unlöslichen Körpers, der den festen Teil der geronnenen Flüssigkeit ausmacht, und eines offenbar gleichzeitig gebildeten löslichen Eiweiſskörpers. *Denis* fand, daſs nach der Koagulation seines „Plasmins“ in der Lösung ein neuer Eiweiſsstoff vorhanden war. Er gab ihm den Namen „lösliches Fibrin“, um es von dem normalen Fibrin der geronnenen Flüssigkeit zu unterscheiden. *Hammarsten* beobachtete, daſs die Zersetzung von der Bildung dieses neuen Körpers begleitet sei, den er als ein bei 64° C. koagulierendes Globulin anspricht. Später hat *Arthus* diese Beobachtung bestätigt. Er fand, daſs in einem mit Oxalsäure versetzten Plasma das Gewicht des durch Zusatz von einem löslichen Kalksalz gebildeten

Digitized by Google

Fibrins geringer ist, als das Gewicht des Fibrinogens, das durch Erhitzen eines gleichen Volumens Plasma auf den Koagulationspunkt erhalten werden kann und daher bedeutend geringer ist, als das Gewicht des vorhandenen Gesamtfibrinogens; denn viele Forscher haben festgestellt, dafs dieser Eiweifsstoff beim Erhitzen seiner Lösungen auf 56° durchaus nicht ganz ausfällt. Ist diese Beobachtung zutreffend, so folgt daraus, dafs bei der Bildung des Fibrins aus dem Fibrinogen eine Spaltung oder Zersetzung des letzteren vor sich gehen mufs. Die Koagulation kann somit nicht das Ergebnis einer Verbindung des Fibrinogens mit Calcium sein, ein Schlufs, der auch bereits auf anderem Wege durch den Versuch als richtig erwiesen ist.

Aufser aus dem Serum und dem Fibrin des entzogenen Blutes kann die Thrombase noch aus vielen anderen Gebilden des Körpers gewonnen werden. *Halliburton* zog sie aus den Leukocyten lymphatischer Drüsen, aus den Drüsen selbst, aus der Brustdrüse und aus den Stromata der roten Blutkörperchen. Er giebt an, dafs ein Eiweifs, das aus dem Muskelsaft gewonnen werden kann, und dem er den Namen Myosinogen gegeben hat, genau dieselbe Wirkung auf verdünntes „gesalzenes Plasma“ hat, wie sein Zellglobulin oder Nucleoalbumin, doch identifiziert er es nicht mit dem Fibrinenzym. *Buchmann* fand, dafs viele Gewebe des Körpers die Fähigkeit besitzen, seröse Flüssigkeiten, die ohne weiteres nicht gerinnbar waren, zur Gerinnung zu bringen. Er führt als solche den Muskel, das Bindegewebe und gewisse Teile des Central-Nervensystems an. *Pekelharing* hat durch Zerreiben von Muskeln in 0,25 prozentiger Sodalösung ein Nucleoalbumin gewonnen, das er durch Zusatz einer eben ausreichenden Menge Essigsäure ausfällte. Er behauptet, dafs dieses Nucleoalbumin das Blut beim Einspritzen in eine Ader zur Gerinnung bringt.

Die Frage der Gerinnung innerhalb der Gefäfse und ihre Beziehung zur Thrombase ist noch nicht aufgeklärt. Obgleich die meisten Forscher einstimmig behaupten, dafs ein Einspritzen eines sehr wirksamen Präparates des Enzymes in die Blutgefäfse eines Tieres keine Gerinnung des Blutes zur Folge habe, so sind doch Abweichungen hiervon beobachtet worden.

Edelberg zeigte, dafs eine intravenöse Einspritzung von *Schmidts* Fibrinferment in der Hohlader, in der rechten Seite

Digitized by Google

des Herzens und in den Lungenarterien eine Koagulation des Blutes bewirken kann. Allgemein kann eine Gerinnung innerhalb der Blutgefäfse durch Einspritzung gewisser Eiweifsstoffe bewirkt werden, die zuerst von *Wooldridge* dargestellt und von ihm „tissue fibrinogens" genannt wurden. Es sind dies, so viel wir jetzt wissen, offenbar Nucleoalbumine, die mit dem von *Pekelharing* aus dem Muskel erhaltenen Produkt und auch vielleicht mit dem Prothrombin, das aus dem Plasma und anderen Quellen gewonnen werden kann, verglichen werden können. Werden diese Körper rasch und in grofsen Mengen injiziert, so findet fast augenblicklich eine Koagulation des Blutes statt. Findet die Injektion aber langsam statt und wird nicht viel Nucleoalbumin eingeführt, so wird das Blut weniger koagulierbar. Die Natur der hierbei stattfindenden Veränderungen und ihre Beziehung zur Bildung oder Wirkung der Thrombase bedarf noch weiterer Aufklärung. *Schäfer* vermutet, dafs diese Nucleoalbumine, wenn sie entweder auf natürliche Weise im zirkulierenden Blut gebildet oder künstlich in die Blutgefäfse eingeführt werden, mit den Kalksalzen des Blutes in Wechselwirkung treten und Thrombase bilden; das Resultat sei eine intravaskuläre Gerinnung. Es läfst sich diese Ansicht jedoch schwer vereinbaren mit der Beobachtung, dafs die Injektion wirksamer Thrombase in die Blutgefäfse im allgemeinen keine Koagulation bewirkt.

Das Fibrinenzym der Krustentiere.

Eine Koagulation, die der des Blutes der Wirbeltiere sehr ähnlich ist, kann auch in der Blutlymphe vieler Krustentiere beobachtet werden; am besten eignen sich hierfür der Hummer (Homarus vulgaris), die Krabbe (Carcinus moenas) und der See- und Flufskrebs. Die in Rede stehende Flüssigkeit, die oft als Blut angesprochen wird, ist ganz blafsrot oder nahezu farblos. Sie ist infolge ihres Gehaltes an zahllosen amöbenartigen Körperchen etwas opalisierend.

Wenn dieses Blut oder diese Blutlymphe dem Tier entzogen und in einem Gefäfs gesammelt wird, so bildet sie sehr schnell einen Gerinnungskuchen, in welchen man ein Fasernetzwerk beobachten kann. Der Kuchen zieht sich ganz bald zusammen und quetscht

Digitized by Google

eine klare Flüssigkeit aus, die in einigen Minuten in Form einer Gallerte zu Boden geht. Der Gerinnungsprozefs scheint in 3 Stadien vor sich zu gehen; das erste Gerinnsel ist nur faserig, die Durchsichtigkeit des zweiten gallertartigen Koagulums läfst erkennen, dafs die Blutkörperchen in dem zuerst gebildeten faserigen Kuchen eingeschlossen sind. Nach einigen weiteren Stunden schrumpft der zweite Kuchen auch und quetscht dabei eine Flüssigkeit aus, die nicht mehr im stande ist zu koagulieren, sondern die das Blutserum darstellt.

Man glaubte ursprünglich, dafs die beiden Gerinnungskuchen verschiedenen Ursprungs seien, dafs der erste aus den Blutkörperchen bestehe, die nach der Art des Plasmodiums der Schleimpilze zusammenfliefsen, während der zweite von der Bildung eines wahren Fibrins herrühre, welches mit dem im Blute der Wirbeltiere gebildeten identisch ist. Diese Ansicht wurde von *Fredericq* ausgesprochen und von *Geddes* und anderen Forschern unterstützt.

Andere wieder glaubten, dafs der zweite Prozefs nur eine Fortsetzung des ersten sei und dafs beide auf eine normale Fibrinbildung zurückzuführen seien, wobei die Kuchen sich hauptsächlich dadurch unterscheiden sollten, dafs das zuerst gebildete Fibrin die Zellen oder Leucocyten in seinen Fäserchen einschliefse.

Halliburton wies im Jahre 1885 die Richtigkeit dieser Ansicht durch sehr eingehende Studien über das Blut oder die Blutlymphe und deren Koagulation nach.

Das Blut enthält zwei Haupteiweifsstoffe; einer derselben ist eine Art Fibrinogen, das sich nur sehr wenig von dem Fibrinogen des Blutes der Wirbeltiere unterscheidet; er besitzt eine etwas höhere Gerinnungstemperatur, bei 65° C. bleibt er noch unverändert. Durch Kochsalz wird er erst bei vollkommener Sättigung mit diesem Salz aus der Flüssigkeit gefällt. Sonst kann er aus seinen Lösungen in genau derselben Weise wie das Fibrinogen der höheren Tiere gefällt werden. Das aus Blut dargestellte und in verdünnter Salzlösung gelöste Präparat koaguliert auf Zusatz von etwas, aus dem Blute eines Wirbeltieres dargestellter Thrombase.

Der Koagulationsprozefs verläuft in derselben Weise und mit denselben Einzelheiten wie der des Blutes der Wirbeltiere.

Er kann durch geeignete Zufuhr von neutralen Salzen, z. B. Magnesiumsulfat, zu dem Blute beim Entziehen verzögert oder

Digitized by Google

verhindert werden. Gewöhnlich ist hierzu eine beträchtliche Menge Salz nötig. Der Prozefs wird durch Kälte in derselben Weise beeinflufst wie die Koagulation des Blutes eines Wirbeltieres.

Die Übereinstimmung in seinem Verhalten mit dem des gewöhnlichen gesalzenen Plasmas (insbesondere die Reaktion mit Thrombase) legt die Vermutung nahe, dafs die Koagulation des Blutes der Krustentiere auf ein Enzym zurückzuführen ist; da das erste Auftreten des Enzyms mit den Leucocyten in direktem Zusammenhange steht, ist man zu dem Schlufs berechtigt, dafs letztere wahrscheinlich die Quelle des Enzyms sind.

Halliburton führte hierüber eine Reihe von Versuchen aus, welche diese Vermutung bestätigten. Er konnte ein Enzym sowohl aus dem Blute, als auch aus dem nach der Koagulation des Blutes ausgeschiedenen Serum gewinnen. Er arbeitete nach *Schmidts* Methode und fand, dafs sowohl der gepulverte Niederschlag, als auch ein Auszug aus demselben mit Leichtigkeit die Lösung des Fibrinogens eines Krustentieres zur Gerinnung brachte. Er stellte aufserdem fest, dafs das auf diese Weise dargestellte Enzym der Thrombase auch insofern glich, als es imstande war, das gesalzene Plasma aus Katzenblut, ebenso die Lösung des Fibrinogens aus einer Wasserbruchflüssigkeit zur Gerinnung zu bringen.

Halliburton giebt an, dafs die amöbenartigen Blutkörperchen die Quelle des Enzyms sind; er beweist jedoch diese Behauptung nicht durch einen schlüssigen Versuch. *Hardy* hat die verschiedenen Arten der im Blute der Krustentiere vorkommenden Körperchen sorgfältig geprüft; er fand darunter solche von blassem Aussehen und von ovaler Form, welche eine kleine Zahl feiner Körnchen enthielten. Bei näherer Betrachtung zeigen diese in grofser Anzahl vorhandenen Körperchen unterm Mikroskop ein eigentümliches Verhalten. Jedes derselben strahlt plötzlich eine Anzahl feiner Scheinfüfschen aus, längs deren kleine Anteile des Plasmas rasch wandern, zu einer Art Bläschen anschwellen und bersten. Die Scheinfüfschen wechseln sehr in Zahl und Gestalt, oftmals schwillt und berstet das Plasma von der Oberfläche der Zelle ohne jede vorausgegangene Füfschenbildung. Gleichzeitig hiermit ändert sich der Zellkern des Körperchens in bemerkenswerter Weise. *Hardy* nannte sie Explosivkörperchen und hat

Digitized by Google

mit ihnen die Bildung des Fibrinenzyms in Verbindung gebracht und zwar deswegen, weil sie die einzigen Körperchen sind, die nach dem Entziehen des Blutes schnell zerstört werden. Er behauptet, es bestehe eine ausgesprochene Beziehung zwischen ihrer Lösung und dem Festwerden des Plasmas und dafs Substanzen, wie z. B. verdünnte Jodlösung, die die Körperchen am Explodieren hindern, die Koagulation des Blutes in etwa demselben Grade verzögern. Er macht auf die feinen Körnchen aufmerksam, die in diesen Zellen auftreten und legt dar, dafs, wenn die Zellen am Auseinanderfallen gehindert werden und die Körnchen sich langsam aus ihnen herauslösen können, der Beginn der Koagulation mit der Zeit des Austritts dieser Körnchen aus den Körperchen korrespondiere. Es ist daher ziemlich wahrscheinlich, dafs diese Explosiv-Körperchen eine Art Fibrinenzym ausscheiden, das jedenfalls mit der aus den höheren Tieren dargestellten Thrombase identisch ist.

Die Koagulation findet, wie wir sahen, in zwei Stadien statt; das erste Stadium verläuft fast augenblicklich und hat zum Ergebnis, dafs die Körperchen in Fibrinstränge eingeschlossen werden. Dies ist auf den Zerfall der „Explosivzellen" und das Freiwerden ihres Enzyms zurückzuführen, welches die sehr schnelle Bildung des Fibrins veranlafst, wobei die Koagulation sich vollzieht, ehe das in Freiheit gesetzte Enzym in gröfserem Mafse diffundiert. Durch die Zusammenziehung der Fibrinstränge des Gerinnungskuchens wird der vom Plasma nicht koagulierte Anteil ausgeprefst, und gleichzeitig verbreitet sich das Enzym in reichlicherem Mafse durch die Flüssigkeit; dieses ist die zweite Phase des Koagulationsprozesses. Obwohl die beiden Koagula von einander dem äufseren Anschein nach wesentlich verschieden sind, so ist es doch zweifelhaft, ob der zweite Prozefs nicht eine Fortsetzung des ersten ohne Unterbrechung ist, denn die angestrengtesten Bemühungen, die erste Gerinnungsmasse aus der Flüssigkeit vor der Bildung des zweiten Koagulums zu extrahieren, blieben gänzlich erfolglos.

Das Myosin-Enzym.

Die Bildung des Myosins, die beim Beginn der Todesstarre charakteristisch ist, ist eine Erscheinung, die vieles mit der Fibringerinnung des Blutes gemein hat. Die Ähnlichkeit der

Digitized by Google

beiden Vorgänge ist von *Kühne* festgestellt worden, der mit Froschmuskeln arbeitete, und von *Halliburton*, der mit Kaninchen, Katzen und Tauben seine Versuche anstellte. Beide Forscher konnten aus den Muskeln durch starken Druck eine Flüssigkeit oder ein Plasma gewinnen, das rasch gelatinierte und einen Gerinnungskuchen bildete. Beim Stehen schrumpfte der Kuchen zusammen und schied eine dem Serum ähnliche Flüssigkeit aus. Die Versuche mufsten alle bei sehr niedriger Temperatur, etwa bei 0°, ausgeführt werden.

Die beiden Kuchen aus Blut- und Muskelplasma unterscheiden sich jedoch wesentlich, sowohl im Aussehen, als auch in ihren Eigenschaften. Während der Blutkuchen faserig und sein Fibrinanteil nach erfolgter Bildung fast unlöslich ist, so ist der Muskelplasmakuchen gelatinös und weich und löst sich leicht in Salzlösungen von mäfsiger Konzentration. Die gebildete und dem Fibrin vergleichbare Substanz ist bekannt unter dem Namen Myosin.

Halliburton zeigte, dafs die beiden Kuchen sich auch noch insofern von einander unterscheiden, als die Salzlösung des Myosins ein zweites Mal verhältnismäfsig leicht zur Gerinnung gebracht werden kann. In einigen Fällen fand er, dafs der Wiederlösungs- und Wiederkoagulierungsprozefs drei- bis viermal wiederholt werden konnte. Eine Salzlösung aus erstarrten Muskeln, in denen die Myosinbildung vor der Entfernung aus dem Körper stattfand, verhielt sich ähnlich.

Ein Muskelplasma, dargestellt durch Auspressen aus frischen von Blut sorgfältig befreiten Muskeln bei 0°, kann lange Zeit, ähnlich wie das Blutplasma, durch Zufügung neutraler Salze flüssig erhalten werden; Magnesium- und Natriumsulfat, auch Kochsalz, haben sich in dieser Beziehung als sehr vorteilhaft erwiesen. Wird ein solches gesalzenes Plasma verdünnt, so geht die Gerinnung langsam vor sich.

Die Gerinnung ist auf ein Enzym zurückzuführen, das sich im Muskel vorfindet und das nach *Halliburton* nach folgender Methode gewonnen werden kann:

Der erstarrte Muskel wird fein zerkleinert und längere Zeit unter absolutem Alkohol stehen gelassen. Die kleinen Stücke werden über Schwefelsäure getrocknet und gepulvert. Ein wässeriger Auszug aus dem Pulver enthält das Enzym.

Digitized by Google

Wird ein derartiger Auszug zu einem gesalzenen Plasma gesetzt, das normalerweise in 12 Stunden gerinnt, so findet die Gerinnung innerhalb einer Viertelstunde statt. Mit der gepulverten Muskelsubstanz erzielt man eine ähnliche Wirkung.

Das Myosin-Enzym ist mit einem Eiweifsstoff von den Eigenschaften einer Deuteroproteose vergesellschaftet, die aus dem Muskelplasma oder aus koaguliertem Muskel, der längere Zeit unter Alkohol gehalten war, ausgezogen werden kann. *Halliburton* neigt mehr der Ansicht zu, dafs diese Substanz das Enzym selbst ist, ebenso wie er behauptet, dafs das Nucleo-Albumin oder Zell-Globulin das Fibrin-Enzym sei.

Dieses Enzym ist vom Fibrin-Enzym wesentlich verschieden, indem es gesalzenes Blutplasma nicht zum Gerinnen bringt; ebenso kann das Fibrin-Enzym nicht das Muskelplasma zur Gerinnung bringen. Sie unterscheiden sich aufserdem in der Temperatur, bei der sie zerstört werden. Während Thrombase bei 70 bis 80° C. gestört wird, wird das Myosin-Enzym erst bei 100° C. gestört.

Auch die Veränderungen, die das Muskelenzym hervorbringt, unterscheiden sich von den bei dem Blutfibrin sich abspielenden. Das Muskelplasma enthält vier Eiweifsstoffe, die beim Erhitzen koagulieren; sie sind von *Halliburton* untersucht worden; sie besitzen folgende Reaktionen:

1. Paramyosinogen — ein bei 47° C. gerinnendes Eiweifs; wird von Magnesiumsulfat in 50 prozentiger Lösung oder in 28 prozentiger Kochsalzlösung gefällt.

2. Myosinogen — ein bei 56° C. koagulierendes Globulin; wird von Magnesiumsulfat in 94 prozentiger und von Kochsalz in 36 prozentiger Lösung gefällt.

3. Myoglobulin — ein bei 63° C. koagulierendes Globulin; wird beim Sättigen der Lösung mit Magnesiumsulfat oder Kochsalz gefällt.

4. Myoalbumin — ein bei 73° C. koagulierendes Eiweifs, das durch Salze nicht ausfällbar ist.

Nach Entfernung dieser Eiweifsstoffe bleibt eine Deutero-Albumose in Lösung.

Das Serum, das bei der Gerinnung entsteht, enthält kein unter 63° C. gerinnendes Eiweifs. Löst man den Gerinnungs-

Digitized by Google

kuchen in verdünnten Salzlösungen und erwärmt die Lösung allmählich, so tritt bei 47° C. und bei 56° C. Koagulation ein.

Der Gerinnungskuchen scheint somit auf den ersten Blick aus den beiden Myosinogenen zu bestehen. Trennt man sie jedoch durch fraktionierte Fällung mit Magnesiumsulfat und löst jedes für sich auf, so tritt nur in der Lösung des zweiten Gerinnung auf. Bei einiger Sorgfalt kann dieses Myosinogen ganz frei von Enzym dargestellt werden, und dann bleibt seine Lösung unbegrenzt lange flüssig. Auf Zusatz von Enzym setzt die Gerinnung ein. Das im Gerinnungskuchen des normalen Plasmas gebildete Myosin scheint das Paramyosinogen einzuschliefsen. Das Paramyosinogen gerinnt weder ohne, noch mit Enzymzusatz.

Die Wirkung des letzteren besteht nach *Halliburton* also darin, dafs es Myosinogen in Myosin umwandelt. Es ist keine Spaltung, wie bei der Überführung des Fibrinogens in Fibrin, da gleichzeitig bei der Gerinnung kein zweites Eiweifs gebildet wird. Jedoch wird gleichzeitig eine Art Milchsäure gebildet, die von derselben einer nebenherlaufenden Zersetzung des Eiweifsstoffes herzurühren scheint. Die Bildung des Myosins ist auch von der Entbindung einer beträchtlichen Kohlensäuremenge begleitet.

Digitized by Google

Kapitel XVII.

Die Gerinnungsenzyme (Fortsetzung). Pektase.

Die Bildung einer pflanzlichen Gallerte, die man bei vielen reifen Früchten beobachten kann, ist auf die Wirkung eines Enzyms auf eine gewisse Substanz zurückzuführen, die aus vielen pflanzlichen Geweben, in einigen Fällen aus den Zellwänden, in anderen aus dem in den Zellen enthaltenen Saft ausgezogen werden kann. Diese Substanz, Pektin genannt, ist ein Glied einer Reihe von Verbindungen, die in den Pflanzen sehr weit verbreitet und gewöhnlich mit der Cellulose in den jungen Zellwänden vergesellschaftet sind. Das Enzym, das bei der Umwandlung des Pektins beteiligt ist, wurde zuerst von *Fremy* im Jahre 1840 untersucht. Er giebt in seiner Abhandlung an, dafs sich in den Zellwänden eine Substanz befindet, die sich in vielen wichtigen Punkten von der Cellulose unterscheidet; er gab ihr den Namen Pektose: sie wird leicht in einen ihr nahestehenden Körper übergeführt, das Pektin, und zwar durch die Wirkung einer Säure. Durch die Wirkung eines Enzyms, das er Pektase nannte und das er aus gewissen Zellen mehrerer Pflanzen ausgezogen hat, kann Pektose oder Pektin in zwei gelatineartige Körper übergeführt werden, nämlich in Pektosinsäure und Pektinsäure. Die Umwandlung verläuft in zwei Phasen; die beiden Säuren werden nacheinander gebildet. Sie unterscheiden sich von dem Pektin lediglich durch ihren Wassergehalt. Die Pektose kommt nach seinen Beobachtungen in zwei Zuständen im Pflanzenkörper vor, manchmal im neutralen Saft von Wurzeln von der Art der Mohrrübe und der roten Rübe gelöst, manchmal im unlöslichen Zustand, z. B. im Saft saurer Früchte. Fügt man die Säfte oder das Fruchtfleisch dieser Pflanzen zu einer Pektinlösung, so gelatiniert diese rasch unter Bildung von Pektosin- und Pektinsäure. *Fremy*

Digitized by Google

giebt weiter an, dafs das Enzym aus dem Safte junger Mohrrüben durch Fällung mit Alkohol gewonnen werden kann. Der feste Niederschlag besitzt enzymatische Wirkung, überträgt diese jedoch nicht auf Wasser. Am besten arbeitet das Enzym bei 30° C.; es wird beim Kochen zerstört. Es wirkt auch bei Abwesenheit von Sauerstoff.

Seit *Fremy* ist das Vorkommen der Pektinsubstanzen in den Pflanzen der Gegenstand sorgfältiger Untersuchungen seitens vieler Forscher gewesen. Insbesondere hat *Mangin* unsere Kenntnisse über die verschiedenen Glieder der Gruppe und ihrer Umwandlungen mit verschiedenen Reagentien erweitert. Auch sind die Besonderheiten der Pektasewirkung und ihre Verbreitung genauer studiert worden.

Die allgemeinen Eigenschaften der Pektinkörper beweisen, dafs sie sich wesentlich von der Cellulose unterscheiden, obwohl sie oft damit verwechselt wurden. Es sind nicht krystallisierbare Körper, die aus ihren Lösungen durch verschiedene Reagentien gefällt werden und dann sehr oft in einem kolloidalen oder gelatinösen Zustand auftreten. Sie werden jedoch sehr schnell durch die zu ihrer Extraktion benutzten Lösungen verändert. *Fremy*, *Scheibler* und *Reichardt* betrachteten sie als Kohlenhydrate, verwandt mit den Schleim- und Gummistoffen. *Mangin* dagegen ist der Ansicht, dafs sie sich durch ihre Reaktionen von den Kohlenhydraten unterscheiden; bei der Oxydation mit verdünnter Salpetersäure liefern sie Schleimsäure, während die Kohlenhydrate in Oxalsäure übergeführt werden. Die Pektinkörper sind in ammoniakalischer Kupferlösung unlöslich, in der sich jedoch die Cellulosen leicht lösen. Letztere färben sich mit Jod bei Gegenwart von Schwefelsäure oder Phosphorsäure violett oder blau; die Pektinkörper liefern keine gefärbten Jodverbindungen.

De Haas und *Tollens* kamen auf Grund der Analysen von Pektinkörpern verschiedenen Ursprunges zu der von *Fremy* und anderen vertretenen Ansicht, dafs sie den Kohlenhydraten verwandt, wenn nicht selbst zuzuzählen sind. Sie zeigen, dafs sie Wasserstoff und Sauerstoff annähernd, wenn nicht genau im Verhältnis von 2 : 1 enthalten, während ihr Kohlenstoffgehalt ungefähr 43 % beträgt. Die Hydrolyse dieser Pektine durch verdünnte Säuren liefert Zucker mit entweder fünf oder sechs

Digitized by Google

Kohlenstoffatomen. *Tollens* vermutet, dafs sie chemisch mit Säuren verbundene Kohlenhydrate sind.

Eine grofse Zahl dieser Pektinkörper ist von verschiedenen Forschern seit 1825 identifiziert und beschrieben worden[1]); beim Vergleich der Arbeiten der verschiedenen Forscher war eine gewisse Konfusion unvermeidlich. *Mangins* Untersuchungen haben die ganze Gruppe auf eine sicherere Grundlage gestellt.

Die Pektinverbindungen können jetzt in zwei Reihen eingeteilt werden; die eine umfafst Körper von neutraler Reaktion, während der anderen die Körper vom Charakter schwacher Säuren angehören. In jeder Reihe finden sich mehrere Körper, die in Bezug auf ihre Löslichkeit die Stadien der leichten und vollkommenen Löslichkeit bis zur absoluten Unlöslichkeit durchlaufen, wobei die dazwischenliegenden Stadien sich in der Form von Gelatinen präsentieren, die durch ihr gröfseres oder geringeres Wasseraufsaugevermögen charakterisiert sind.

Zwei dieser Körper sind für das Studium des Enzyms von besonderem Interesse. Einer, das Pektin, gehört zu den neutralen Körpern, der andere, die Pektinsäure, zu der Säurereihe. Nach *Mangin* besitzen sie folgende Reaktionen:

Pektin. Diese Substanz schwillt auf und löst sich in Wasser, wobei sie eine zähe, schwer filtrierbare Flüssigkeit liefert, die beim Konzentieren Neigung zeigt, zu gelatinieren. Sie ist auch in verdünnten Säuren löslich; aus dieser Lösung kann sie mit Alkohol gefällt werden. Mit neutralem Bleiacetat liefert sie keine Fällung, wird jedoch von basischem Bleiacetat in Form weifser Flocken gefällt. Bei mehrstündigem Kochen mit Wasser wird sie in ein Isomeres, Parapektin, übergeführt, das von neutralem Bleiacetat gefällt wird. Weiteres Kochen mit verdünnten Säuren führt dieses in Metapektin über, das von Chlorbaryum gefällt wird.

Pektinsäure. Dieser Körper ist unlöslich in Wasser, Alkohol und Säuren; er liefert mit Alkalien lösliche, mit den Metallen der alkalischen Erden unlösliche Pektate, von denen das

---

[1]) Der Verfasser hat über diese Untersuchungen im „Science Progress", Vol. VI, S. 344 unter dem Titel: „Die Zellmémbran" ein Sammelreferat veröffentlicht.

Digitized by Google

Calciumpektat sehr weit verbreitet ist. Die Pektinsäure löst sich in schwachen Alkalien auf, z. B. in Pottasche- und Sodalösung, in Stannaten, alkalischen Phosphaten und in den meisten organischen Ammoniaksalzen unter Bildung von Doppelsalzen, die mehr oder weniger leicht mit Wasser gelatinieren. Ihre Lösungen in Alkalikarbonaten sind schleimig und schwer zu filtrieren; dagegen bleibt die Lösung in oxalsaurem Ammoniak vollkommen flüssig und leicht filtrierbar.

Die Entdeckung des Enzyms durch *Fremy* ist von neueren Forschern bestätigt worden; man kennt jetzt die Natur der von ihm bewirkten Umwandlungen ganz genau.

Den vollständigsten Aufschlufs über die Eigenarten der Pektase lieferten *Bertrand* und *Mallèvre*, die im Jahre 1895 und in den folgenden Jahren mehrere Abhandlungen über diesen Gegenstand veröffentlichten.

Sie stellten das Enzym zuerst aus dem Safte der Mohrrüben dar, die zu diesem Zwecke kultiviert und im Stadium des kräftigsten Wachstums geerntet waren. Wie bereits erwähnt, gab auch *Fremy* bereits an, dafs die Wurzeln dieser Pflanzen Pektase enthalten.

Bei ihren Untersuchungen trennten *Bertrand* und *Mallèvre* die centralen Cylinder der Wurzeln von der Rinde, zerkleinerten sie zu einem Brei und prefsten dann den Saft aus. Etwa 70 bis 80 % der Breimasse liefsen sich in der Form einer trüben Flüssigkeit auspressen, die dann mit Chloroform versetzt und durch Berzelius-Filtrierpapier filtriert wurde.

Dieser Saft bewirkte bei Zusatz zu Pektinlösungen schnell die Bildung einer Gallerte, gerade so wie es *Fremy* früher beobachtet hatte.

Fremy und seine unmittelbaren Nachfolger glaubten, dafs diese Gallertbildung auf der Umwandlung des Pektins in Pektinsäure beruhe. Letztere gelatinierte leichter und in weniger konzentrierten Lösungen als Pektin. Eine vollkommen klare und nicht gelatinierende Pektinlösung gelatiniert auf Zusatz von Pektaselösung leicht zu einem weichen Kuchen.

Wenn auch *Bertrand* und *Mallèvre* so die Ergebnisse der *Fremy*schen Versuche bestätigten, so kamen sie doch bezüglich der Natur des gebildeten Produktes zu anderen Schlüssen. Sie

Digitized by Google

fanden, dafs die Lösung der Gelatine in Salzsäure eine gewisse Menge Kalk enthielt, der auf Zusatz von Ammoniak nicht gefällt wurde. Fortgesetzte Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dafs nicht Pektinsäure, sondern pektinsaurer Kalk gebildet wurde.

Weitere Untersuchungen sollten darthun, ob die Spaltung von der Anwesenheit von Calcium abhängig sei.

Man stellte eine gereinigte Pektase aus der Rohpektase dar durch Zusatz von oxalsaurem Alkali behufs Fällung des etwa im Karottensaft enthaltenen Kalkes. Nachdem der Niederschlag sich abgesetzt hatte, filtrierte man; das Filtrat war klar.

Dann stellte man aus dem Prefsrückstand des breiigen Gewebes der Wurzel Pektin dar. Dieses Material wurde mit Alkohol gewaschen und 15 Minuten gekocht, das Gemisch vor dem Erkalten filtriert.

Der Rückstand auf dem Filter war auf diese Weise von anhängender oder löslicher Pektase befreit und wurde dann mit 2prozentiger Salzsäure extrahiert, in der das Pektin löslich ist. Eine 24stündige Maceretion genügte zur Extraktion des Pektins. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Flüssigkeit abfiltriert und das Filtrat mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt. Das Pektin wurde in Form von gelaktinösen Flocken gefällt, die gesammelt und auf einer porösen Unterlage getrocknet wurden. Zum Nachweis der Abwesenheit von Kalkverbindungen wurden sie in 50prozentigen Alkohol gegeben, der 2% Salzsäure enthielt. Diese Behandlung wurde so lange fortgesetzt, bis das Pektin beim Veraschen nur noch eine Spur Asche ergab, die frei war von Kalk. Es wurde dann durch Lösen in Wasser und nachheriges Fällen mit Alkohol von Salzsäure befreit. Nach mehrmaliger Wiederholung war die Säure in der Hauptsache entfernt; die letzten Spuren Säure wurden durch Zusatz einiger Tropfen verdünnter Kalilauge entfernt.

Bertrand und *Mallèvre* fanden, dafs eine 2prozentige Lösung des auf diese Weise dargestellten Pektins vollkommen klar blieb und zu weiteren Versuchen sehr geeignet war. Fügten sie zu dieser Lösung den in oben beschriebener Weise dargestellten entkalkten Saft der Mohrrübe, so blieb sie trotz des Vorhandenseins grofser Menge von Pektase unbegrenzt lange klar. Der Zusatz auch nur einer Spur eines löslichen Kalksalzes bewirkte die

Digitized by Google

Bildung einer Gallerte und zwar richtete sich die Schnelligkeit, mit der die Gallerte sich bildete, nach der Menge des zugesetzten Kalksalzes. Der Zusatz eines Kalksalzes allein oder von Kochsalz und gekochtem Karottensaft führte niemals zur Gallertbildung.

Baryum und Strontium spielten dieselbe Rolle wie das Calcium, wenn ein Überschufs davon zugesetzt wurde. Magnesium war andererseits ohne Wirkung oder doch nur von schwacher.

Die durch Einwirkung der Pektase auf Pektin gebildete Gallerte besteht daher aus Kalkpektat und nicht aus freier Pektinsäure, wie frühere Forscher annahmen.

Wie erinnerlich, findet beim Lab eine ähnliche Vereinigung von Kalk mit Kaseïn statt; das gebildete Tyreïn ist nach *Halliburton* ein Kalkkaseat.

Bertrand und *Mallèvre* fanden, dafs der Zusatz einer festen Menge löslichen Kalksalzes auch ohne die Gegenwart der Pektase eine Gelatinebildung bewirkt. Diese beruht jedoch nicht auf der Bildung von Pektinsäure oder Calciumpektat, sondern auf der Bildung einer anderen Verbindung, die sie als Pektinat bezeichneten. Letzteres wurde auch bei Gegenwart von Pektase beim Arbeiten mit einem grofsen Überschufs an Kalksalz erhalten. Die beiden gelatinösen Körper können von einander mittelst einer 2prozentigen Salzsäurelösung unterschieden werden. Diese löst nämlich das Pektinat, so dafs die von letzterem gebildete Gallerte verschwindet. Sie zersetzt das Calciumpektat durch Entziehung des Kalkes unter Bildung freier Pektinsäure, die in Säuren unlöslich ist und daher im Gelatinezustand verbleibt.

Die Pektase wird in ihrer Wirkung durch freie Säuren wesentlich gehemmt; man kann sagen, dafs die Gallertbildung nur in neutraler Lösung vor sich geht. Mischt man gleiche Raumteile des ausgeprefsten Karottensaftes und zweiprozentige Pektinlösung, so bildet sich die Gallerte gewöhnlich in etwa einer Stunde. Zusatz von Salzsäure zu diesem Gemisch verzögert die Gallertbildung wesentlich und zwar um so mehr, je gröfser die Menge der zugesetzten Salzsäure war; 0,09 % verzögert die Gallertbildung um beinahe zwei Tage, und 0,1 % hindert sie gänzlich. Gleiche Ergebnisse lieferten Schwefelsäure, Salpetersäure, Weinsäure und Citronensäure.

Digitized by Google

Diese Beobachtung ist wichtig, denn sie erklärt es, warum sich in manchen Früchten keine Gallerte bildet, weil diese nämlich aufser dem Enzym eine Säuremenge über 0,1 % aufweisen.

Der verzögernde Einflufs der Säure wird durch die Gegenwart einer gröfseren Menge von Kalksalzen oder von Pektase gemildert. Dies erklärt, warum die Säfte der Kirschen und Stachelbeeren Pektin koagulieren, obwohl sie ziemlich sauer sind. Die Gallertbildung ist in letzter Instanz abhängig von dem relativen Verhältnis der Pektase, der Kalksalze und der freien Säure, die in der Lösung nebeneinander enthalten sind.

Wie bereits erwähnt, verneinte *Fremy* die Existenz der löslichen Pektase in sauren Früchten. Er gab an, dafs in diesen das Enzym in unlöslicher Form enthalten sei und dafs es von dem festen Fruchtfleisch nicht getrennt werden könne. Er erklärte auf diese Weise die Thatsache, dafs letzteres Pektinlösungen gelatiniert, während dies der aus dem Fruchtfleisch ausgeprefste Saft nicht that. *Bertrand* und *Mallèvre* wiederholten ihre Versuche mit dem ausgeprefsten Saft und führten sie weiter. Obwohl der aus der Frucht ausgeprefste Saft, ganz wie *Fremy* angab, Pektin nicht gelatinierte, so fanden sie, dafs dies sofort der Fall war, wenn etwas Alkali zur Neutralisation der vorhandenen Säure zugesezt wurde. Es lag daher nicht an der Abwesenheit der Pektase, sondern an der Anwesenheit der Säure, die die Pektase in ihrer Wirkung hinderte.

Diese Forscher widersprechen *Fremy* auch noch in einem anderen Punkte; sie fanden, dafs bei längerer Maceration die Pektase aus dem durch Alkohol aus dem ausgeprefsten Karottensaft gefällten Niederschlag extrahiert werden kann.. Sie wird also durch diese Behandlungsweise nicht, wie *Fremy* angab, absolut unlöslich.

Bertrand und *Mallèvre* fanden, dafs die Pektase nicht auf Fruchtfleisch allein beschränkt, sondern dafs sie im Pflanzenreich sehr weit verbreitet ist. Sie gehen so weit, dafs sie sagen, sie sei in jenen Pflanzen überhaupt enthalten, besonders reichlich in den Laubblättern, in denen sie nach ihrer Vermutung gebildet wird und von wo aus sie sich in die übrigen Organen der Pflanze verbreitet. Blätter, die ein rasches Wachstum zeigen, sind gewöhnlich am enzymreichsten.

Digitized by Google

Ein sehr wirksames Präparat wurde aus den Blättern der Luzerne (Medicago sativa) und des Klees (Trifolium pratense) erhalten. Die Pflanzen wurden im Stadium des kräftigsten Wachstums geerntet und im Mörser zerkleinert; dann wurde der Saft extrahiert. Dieser wurde mit Chloroform gesättigt und 24 Stunden in einer Flasche im Dunkeln stehen gelassen. Es setzte sich ein beträchtlicher Bodensatz ab, der durch Filtration entfernt wurde. Die auf diese Weise erhaltene klare Flüssigkeit wurde in das zweifache Volumen 90 prozentigen Alkohols gegossen, wobei ein reichlicher Niederschlag entstand. Dieser wurde von der überstehenden weingeistigen Flüssigkeit getrennt und 12 Stunden mit einer kleinen Menge Wasser behandelt. Auf diese Weise wurde aus dem Gemisch der Saftbestandteile die Pektase gewonnen; beim Filtrieren erhielt man eine fast farblose Flüssigkeit. Das Enzym wurde wieder durch Zusatz eines Alkoholüberschusses gefällt, auf dem Filter gesammelt und im Vakuum getrocknet. Auf diese Weise erhielt man 5—8 % eines weifsen Pulvers, das sehr hygroskopisch und leicht löslich in Wasser war. Seine Lösung besafs in hohem Mafse die Eigenschaft, die pektische Gärung zu erregen. Eine einprozentige Pektinlösung wurde innerhalb 40 Stunden auf Zusatz von $^1/_{1000}$ ihres Gewichtes Luzernenpektase oder von $^1/_{1600}$ ihres Gewichtes an Kleepektase koaguliert.

Durch ähnliche Versuche wiesen *Bertrand* und *Mallèvre* die Pektase in folgenden Pflanzen nach:

Spirogyra
Chara fragilis
Marchantia polymorpha
Lolium perenne (Blätter)
Zea Mays (Blätter)
Iris florentina (Blätter)
Ginkgo biloba (Blätter)
Thuja occidentalis (Blattschöfslinge)
Pinus Laricio (Nadeln)
Cydonia vulgaris (Frucht)
Pyrus communis (Frucht)
Malus communis (Frucht)
Rubus idaeus (Frucht)
Armeniaca vulgaris (Frucht)
Cucurbita Pepo (Stamm, Blatt, Blüte, Frucht)
Rheum rhaponticum (Blätter)
Beta vulgaris (Blätter u. Wurzeln)
Plantago media (Blätter)
Mentha Pulegium (Blütenköpfe)
Solanum Lycopersicum (reife Frucht)
Solanum tuberosum (Blätter)
Alanthus glandulosa (Blätter)
Ampelopsis quinquefolia (Blätter)
Brassica napus (Blätter und Wurzeln)

Digitized by Google

Brassica oleracea (Blätter)
Syringa vulgaris (Blätter)
Helianthus tuberosus (Blätter)
Sambucus nigra (Blätter)
Daucus carota (Wurzeln)
Ribes rubrum (Frucht)
Ceratophyllum submersum (ganze Pflanze)
Robinia pseudacacia (Blätter)
Medicaga sativa (Schöfslinge)
Trifolium pratense (Schöfslinge)
Vitis vinifera (Blätter, Frucht)
Acer pseudo-platanus (Blätter)
Delphinium Staphisagria (Blätter)

In Thuja konnte sie nicht mit Bestimmtheit nachgewiesen werden, wegen der zähen Beschaffenheit des Zellsaftes.

Über die Menge der in diesen verschiedenen Pflanzen gefundenen Pektase verschaffte man sich in der Weise Aufschlufs, dafs man eine bestimmte Menge des Pflanzenauszuges auf eine 2prozentige wässerige Pektinlösung wirken liefs und die Zeit beobachtete, die bis zur Gelatinierung verstrich. Die erhaltenen Ergebnisse sind folgende:

Solanum Lycopersicum (reife Frucht) . .	48 Stunden
Vitis vinifera (nahezu reife Frucht) . .	24 „
Ribes rubrum (weifse Johannisbeere) . .	15 „
Rheum rhaponticum (Blätter)	22 „
Marchantia polymorpha (Thallus)	$2^1/_4$ „
Daucus carota (ausgewachsene Wurzel) . .	2 „
Delphinium Staphisagria (Blätter) . . .	$1^1/_2$ „
Ginkgo biloba (Blätter)	35 Minuten
Syringa vulgaris (Blätter)	20 „
Ailanthus glandulosa (Blätter)	20 „
Daucus carota (junge Wurzel)	15 „
Zea mays (Blätter)	8 „
Iris florentina (Blätter)	3 „
Trifolium pratense (Schöfsling) . .	weniger als 1 Minute
Medicago sativa (Schöfsling) . . .	„
Solanum tuberosum (Blätter) . . .	„
Brassica napus (Blätter)	„
Plantago media (Blätter)	„
Lolium perenne (Blätter)	„

Aus diesen Zahlen gewinnt man ein Bild über die vorhandene Pektasemenge. Diese wechselt also innerhalb sehr weiter Grenzen. In manchen Fällen ist die Gelatinierung eine fast

Digitized by Google

augenblickliche. Bei anderen Pflanzen, die offenbar nur geringen Pektasegehalt aufweisen, findet die Gelatinierung nur langsam und unsicher statt. In solchen Fällen erhält man die besten Ergebnisse beim Arbeiten mit genau neutralen Saft- und Pektinlösungen und unter Zufügung von etwas Kalksalz. Es ist nicht immer nötig, dafs ein langsamer Prozefs zweifellos auf eine kleine Pektasemenge hinweist, denn letztere wirkt nicht immer gleichmäfsig; ihre Wirkung bedingen nämlich zwei Faktoren: Die Reaktion des Mediums und die Menge der vorhandenen Kalksalze.

Die Verteilung des Enzyms wechselt ebenfalls in derselben Pflanze. Bei den Versuchen mit Cucurbita Pepo (Kürbis) fand die Gerinnung statt je nach den verwendeten Pflanzenteilen:

Blumenkrone	45 Minuten,	Stammscheitel	12	Minuten
Junge Frucht	30 „	Blattstiel	8	„
Stammbasis	20 „	Blatt	1	„

Erwähnt wurde bereits, dafs die Wirkung der Pektase durch die Reaktion der Flüssigkeit und durch die Anwesenheit von Kalksalzen wesentlich beeinflufst wird. *Bertrand* und *Mallèvre* fanden, dafs diese bestimmenden Faktoren nicht unabhängig voneinander sich geltend machen. Wir sahen, dafs Kalksalze zur Koagulation notwendig sind, aus dem Hauptgrund, weil sie als Bestandteil in den Gerinnungskörper eintreten. Es scheint dies jedoch nicht die ausschliefsliche Rolle zu sein, die sie spielen, denn die Gelatinierung wird durch Zugabe von mehr Kalksalz beschleunigt, auch wenn genügend Kalk zur Bindung der Pektinsäure bereits vorhanden ist. Hinwiederum ist die Gegenwart freier Säure der Wirkung der Pektase hinderlich. *Bertrand* und *Mallèvre* fanden bei einem Versuche, dafs ein Gemisch gleicher Raumteile Karottensaft und 2prozentiger Pektinlösung innerhalb einer Stunde gelatinierte. Bei Zusatz von Salzsäure zu einem ähnlichen Gemisch wurde die Gelatinierung ganz im Verhältnis zur zugesetzten Salzsäuremenge verzögert. 0,088 % verzögerten 40 Stunden, und 0,1 % hemmten sie ganz. Die gleiche Wirkung übten Schwefelsäure, Apfelsäure, Weinsäure und Citronensäure aus.

Dieser verzögernde Einflufs wurde durch das Vorhandensein gröfserer Mengen Kalksalze oder Pektase abgeschwächt, so dafs die Gerinnung von diesen drei Faktoren abhängt: Pektase, Säure und Kalksalz.

Digitized by Google

Die Natur der Pektasewirkung ist noch nicht sichergestellt; die Thatsachen deuten jedoch darauf hin, dafs die Pektase das Pektin in Pektinsäure überführt und dafs diese dann mit dem Kalksalz unter Bildung von Calciumpektat reagiert.

Die weite Verbreitung der Pektase, die in der That überall da, wo man sie gesucht hat, gefunden wurde, in Verbindung mit der allgemeinen Thatsache, dafs die Pektinkörper in der Zellwand mit der Cellulose verbunden sind, läfst der Vermutung Raum, dafs ihre Funktion in der lebenden Pflanze mit den Veränderungen, die die Zellmembranen während des Lebens der Zelle erleiden, in Verbindung steht. Durch die Untersuchungen verschiedener Forscher, von *Braconnot* im Jahre 1825 bis auf *Mangin* in den letzten Jahren, ist zweifellos erwiesen, dafs zu keiner Zeit die Membran der Zellwand aus reiner Cellulose besteht. Zwar ist die letztere der Hauptbestandteil der Zellwand, doch enthält diese noch eine ganze Anzahl anderer Körper, die in der Art und in der Menge wechseln und die etwas unzusammenhängend als Pektase, Pektin, Pektinsäure, Metapektinsäure und deren Verbindungen beschrieben wurden. Diese Körper sind in neuerer Zeit von *Mangin* untersucht worden, der mehrere derselben isolierte und ihre Reaktionen beschrieb. Sie zerfallen in zwei Reihen, deren jede mehrere Glieder aufweist, die alle Stufen der Löslichkeit zeigen, von der leichtesten Löslichkeit in Wasser bis zur absoluten Unlöslichkeit. Die Zwischenkörper bilden Gelatinen, die durch ihr gröfseres oder geringeres Wasseraufnahmevermögen charakterisiert sind.

Die erste Reihe, zu der das Pektin gehört, besteht aus Körpern mit neutraler Reaktion; die Glieder der zweiten Reihe sind schwache Säuren. Die hervorragendste unter diesen ist die Pektinsäure. Die beiden Reihen sind eng mit einander verwandt, denn durch die Einwirkung von Hitze, Säuren und Alkalien können die verschiedenen Glieder der beiden Reihen aus Pektose dargestellt werden, dem am wenigsten löslichen der neutralen Körper. Diese Körper sind in Gesellschaft mit der Cellulose in allen Membranen enthalten, die noch nicht in Lignin und Suberin übergegangen sind; sie können durch Behandeln der Zellwand mit verschiedenen Reagentien von dieser getrennt werden. Die Pektinsäure kommt gewöhnlich nicht im freien Zustand vor,

Digitized by Google

sondern, wie dies schon *Payen* feststellte, in Verbindung mit Kalk als Calciumpektat.

Payen stellte ferner fest, dafs die sogenannte „Mittel-Lamelle“ zwischen zwei aneinander anstofsenden Zellen fast ausschliefslich aus Calciumpektat besteht; diese Beobachtung ist neuerdings durch *Mangin* bestätigt worden. Man kann leicht nachweisen, dafs diese Schicht, welches auch immer ihr Ursprung sei, nicht dieselbe Zusammensetzung hat, wie die übrige Zellwand, da sie leicht durch Reagentien gelöst werden kann, die die Zellen scheinbar intakt lassen, wenn sie auch voneinander getrennt sind. Am wirksamsten ist in dieser Beziehung die sogenannte „Macerationsflüssigkeit“ von *Schultze*, die aus einer Lösung von chlorsaurem Kali in Salpetersäure besteht.

Dieser Unterschied in der Zusammensetzung der Mittellamelle und der übrigen Zellwand ist bereits seit langem bekannt. Ehe ihr der Name Mittellamelle von den Forschern aus der Zeit von *Nägeli* und *Sachs* gegeben war, nannte man sie „Intercellular-Substanz“; man hielt sie für eine Art Cement, der die benachbarten Zellen aneinander kittet.

Aufser der Mittellamelle haben noch andere Modifikationen der ursprünglichen Zellwand von Zeit zu Zeit die Aufmerksamkeit der Forscher erweckt. Unter diesen ist besonders das „Intercellular-Plasma“ von *Russow* zu nennen, das nach diesem Forscher in gewissen Fällen eine zarte Membran bilden soll, die die intercellularen Durchgangsstellen auskleidet. *Russows* Anschauung, dafs diese Substanz protoplasmatischer Art sei, wurde von mehreren späteren Forschern bekämpft, die nachwiesen, dafs sie ein Abkömmling der Zellwand ist. *Schenck* glaubt, sie gleiche von Natur der Mittellamelle, und *Mangin* meinte, sie sei ein Gemisch von Pektinstoffen, die Calciumpektat einschliefsen.

Die Untersuchungen von *Mangin* haben das Verhältnis der neutralen Pektinkörper zu den Pektinsäureverbindungen in verschiedenen Zellwänden aufgeklärt. In den jungen, unveränderten Membranen findet sich nur wenig Pektinsäure, dagegen Pektose in gröfserer Menge. In älteren Zellwänden, besonders in Geweben, in denen Intercellularräume entstanden sind, nimmt die Pektinsäure an Menge zu. Wie bereits gesagt, besteht die Mittellamelle fast ganz, wenn nicht überhaupt ganz daraus; sie sammelt

Digitized by Google

sich oft auf der Oberfläche der Intercellular-Räume an und stellt in solchen Fällen eine Fortsetzung der Mittellamelle der Zellwand dar, die sich bei der Bildung des Durchganges gespalten hat.

Selbst die jüngsten Zellen können durch Reagentien, die Calciumpektat lösen, voneinander getrennt werden, so dafs wohl Grund genug zu der Annahme vorhanden ist, dafs die Zellmembran zu keiner Zeit absolut homogen ist, sondern aus einer Mittelschicht von Calciumpektat besteht, die auf beiden Seiten von einer Schicht bedeckt ist, die aus einem Gemisch von Zellstoff und Pektase besteht. Beim Wachsen tritt diese Lage Calciumpektat mehr hervor, bis sie unter dem Mikroskop sichtbar wird. Diese Veränderung beruht auf Umwandlungen, die die Zusammensetzung der an die Zellhöhlen anstofsenden Schichten beeinflussen und die in einer vermehrten Bildung von Calciumpektat in die Erscheinung treten.

Die Art und Weise, wie sich das Calciumpektat über die Oberfläche der Zellhohlräume ablagert, giebt uns möglicherweise einen Anhalt zur Erklärung der Vorgänge.

Diese Pektate schreiten allmählich nach der Aufsenseite der Membran fort, gehen möglicherweise als lösliche Pektinsäure in ihre Substanz über und verbinden sich auf der äufseren Oberfläche oder auch im Intercellularraum mit der metallischen Base.

In der jungen, wachsenden Zelle besteht gerade hinter der Zone der Zellteilung am wachsenden Punkt das Maximum des osmotischen Drucks. Es ist ganz begreiflich, dafs dieser Druck in einer an einen Intercellularraum anstofsenden Zelle zur Erzeugung eines Stromes löslicher Substanzen durch die Substanz der Zellmembran von innen nach aufsen genügt. Dies würde dann zur Ausscheidung solcher löslichen Pektate oder Pektinkörper führen, wie man sie in der Zellwand findet. Die Körper dieser Reihe werden wahrscheinlich in der Membran aus dem Pektin oder der Pektose durch die Wirkung verdünnter Säure des Zellsaftes oder wahrscheinlicher durch die Pektase gebildet, die nach *Bertrand* und *Mallèvre* in vielen Fällen in der Spitzenregion des Stammes vorhanden ist. Ein solcher Umwandlungsverlauf ist noch wahrscheinlicher in den Zellen und Zellwänden der jungen Blätter, die Pektase oft in grofsen Mengen enthalten.

Digitized by Google

Die gleiche Betrachtung kann man mit noch gröfserer Wahrscheinlichkeit in Bezug auf die Bildung der Mittellamelle anstellen. Wo die Zellen nicht an einen Intercellularraum anstofsen, sondern auf ihre Nachbarzellen einen Druck ausüben, wie dies in dem jungen Teil der wachsenden Zone der Fall ist, sei es im Stamme, Blatt oder in der Wurzel, da ist jede der Membranen einem Druck von allen Seiten ausgesetzt, der durch die Schwellung der benachbarten Zellen bewirkt wird. In diesem Falle geht der Strom der Pektinsäure oder Pektate nicht durch die Zelle hindurch, sondern häuft sich in der Mittellinie zweier Drucklinien an, d. h. in der Gegend, in der die Mittellamelle ganz bald sichtbar wird.

Obwohl noch nicht mit Bestimmtheit nachgewiesen ist, dafs die Umwandlung des Pektins in Pektinsäure unter der Einwirkung der Pektase die Ursache der Bildung der Mittellamelle ist, was augenblicklich mehr eine Hypothese als eine bewiesene Thatsache ist, so wird diese Hypothese doch durch das Vorkommen der Pektase wahrscheinlich gemacht. *Bertrand* und *Mallèvre* fanden sie in reichlicher Menge überall da, wo das Zellenwachstum am kräftigsten war, und je schneller das Wachstum, um so reichlicher das Enzym. Sie fanden im Blatte selbst achtmal mehr als im Blattstiel und mehr als zweimal so viel am Scheitel des Stammes als an der Basis. In der Blütenkrone des Kürbis, in der sich kaum eine Verdickung der Zellwand bemerkbar macht, betrug das Verhältnis der Pektase zu der im Laubblatte vorhandenen 1 : 45.

Die Thatsache, dafs die Pflanzen bei Abwesenheit von Calcium nur sehr wenig zu wachsen vermögen, mag zum Teil mit denselben Erscheinungen im Zusammenhang stehen.

Digitized by Google

Kapitel XVIII.

Ammoniakalische Gärung. Urease.

Der Urin reagiert beim Verlassen des Körpers zuerst schwach sauer; beim Stehen an der Luft wird er nach einiger Zeit alkalisch, die Stärke der Reaktion wächst allmählich, und nach etwas längerer Zeit entwickelt der Urin einen deutlichen Geruch nach Ammoniak. Wird der Urin nach dem Lassen sterilisiert und aufser Berührung mit der Luft gehalten, so findet diese Veränderung nicht statt.

Prüft man den veränderten Urin, so findet man, dafs der Vorgang auf einer Überführung des Harnstoffes in kohlensaures Ammoniak beruht, die sich nach dem einfachen Vorgang der Hydrolyse vollzieht nach der Gleichung:

$$CO(NH_2)_2 + 2\,H_2O = (NH_4)_2\,CO_3.$$

Diese Zersetzung des Harnstoffes hat man fast so lange, als sie bekannt ist, als eine Gärung betrachtet. Noch ehe eine chemische Untersuchung über die Zusammensetzung des sich zersetzenden Harnes stattgefunden hatte, vermuteten *Fourcroy* und *Vauquelin*, dafs die Änderung seiner Reaktion auf die Umwandlung des Harnstoffes zurückzuführen sei und durch eine fermentative Wirkung der im Harn enthaltenen eiweifsartigen Substanz verursacht werde. *Dumas* war ähnlicher Ansicht, er meinte jedoch, das Enzym habe in dem Schleim seinen Ursprung, der sich fast regelmäfsig im Urin vorfindet. *Jacquemart* schrieb die Fermentativwirkung dem weifsen Bodensatz zu, der sich allmählich beim Stehen des Urins absetzt. Er war derselben Ansicht wie *Fourcroy*, dafs der »Fermentstoff« amorph sei.

Ums Jahr 1860 herum begannen sich die Vorstellungen zu klären.

Digitized by Google

Ein deutscher Chemiker, *Müller*, sprach die Vermutung aus, dafs die Wirkung auf lebende Organismen zurückzuführen sei, ähnlich der Bierhefe. Einige Jahre später entdeckte *Pasteur* in fauligem Urin einen derartigen Organismus. Er beschrieb ihn als aus kleinen runden, miteinander in Ketten verbundenen Zellen bestehend. Die Zellen sahen fast ganz so aus wie Hefezellen, waren jedoch viel kleiner. Wegen dieser Ähnlichkeit nannte man den Organismus zuerst Torula ureae. *Van Tieghem* studierte ihn im Jahre 1864 sehr sorgfältig und bestätigte dabei *Pasteurs* Ansichten. Später nannte *Cohn* den Organismus Micrococcus ureae. Er besteht aus kugelförmigen Zellen, deren mittlerer Durchmesser 1,5 μ beträgt; sie sind miteinander zu langkurvigen Ketten verbunden, die sich in der ganzen Flüssigkeit während der Dauer der Gärung vorfinden. Ist diese vorüber, dann gehen sie zu Boden, die Ketten brechen auseinander, so dafs der Bodensaft aus kleinen Ketten oder freien Kügelchen besteht. Die Zellen zeigen keine Körnung; ihre Zellwand ist kaum von dem Inhalt zu unterscheiden, und sie vermehren sich zumeist durch Sprossen.

Der Micrococcus ureae kann sehr leicht in Urin gezüchtet werden; er wächst jedoch auch in jeder stickstoffhaltigen Flüssigkeit, die Urin gelöst enthält, oder in einer phosphathaltigen Urinlösung. Nach *Jaksch* wächst er auch ohne Urin, wenn statt dessen andere Amide oder Peptone zugegen sind.

Der Organismus ist aërob.

Eine besondere Lebenserscheinung beobachtete *van Tieghem*: Der Mikrokokkus wächst nämlich noch in stark alkalischen Lösungen. Er beobachtete, dafs die Gärung in Flüssigkeiten mit 13 % kohlensaurem Ammoniak noch andauerte, eine Konzentration, die fast allen anderen Formen vegetabilischen Lebens verderblich sein würde.

Van Tieghem stellte ferner fest, dafs dieser Organismus auch Hippursäure zersetzt, die sich in grofser Menge im Harne der Pflanzenfresser findet; als Zersetzungsprodukte derselben treten Benzoesäure und Glycin auf. Auch dieser Prozefs ist eine Hydrolyse, die nach folgender Gleichung verläuft:

$$C_9H_9NO_3 + H_2O = \begin{cases} C_6H_5 \\ COOH \end{cases} + \begin{cases} CH_2NH_2 \\ COOH \end{cases}$$

Hippursäure Benzoesäure Glycin.

Digitized by Google

Setzt man eine Lösung von Hippursäure in Hefenwasser oder in einer phosphathaltigen Zuckerlösung der Luft aus, so fängt der Mikrokokkus bald an, in der Flüssigkeit zu wachsen, wodurch die eben erwähnten Umwandlungen bewirkt werden.

Sestini fand, dafs andere Organismen auch die Harnsäure hydrolysieren, wobei als Umsatzprodukte kohlensaures Ammoniak und Kohlensäure entstehen.

Der Mikrokokkus ist bei weitem nicht der einzige Mikrobe, der imstande ist, den Harnstoff zu zersetzen. Wir verdanken den Untersuchungen *Miguels* und anderer Forscher die Kenntnis vieler anderer Organismen, die seine Hydrolyse bewerkstelligen. Einige darunter sind gewöhnliche Pilze, die meisten aber gehören zur Gruppe der Schizomyceten oder Spaltpilze. *Miguel* hat sieben Arten Bacillus, neun Arten Micrococcus und eine Sarcina beschrieben. Die Bazillen scheinen höchst energisch zu wirken.

Die Organismen sind in der Natur sehr verbreitet; sie finden sich in der Luft, im Quell- und Flufswasser und im Boden. Nach *Miguel* sind 1—2 % der Bodenbakterien und 15 % der Kuhstallbakterien imstande, den Harnstoff zu hydrolysieren.

Der Harn scheint normalerweise kein Nährstoff für die Organismen zu sein. Finden sich in der Kulturflüssigkeit andere stickstoffhaltige Verbindungen, insbesondere Eiweifsstoffe, so deckt er aus diesen Quellen seinen Stickstoffbedarf. Fehlt es jedoch an diesen Stoffen, so benutzt er den Stickstoff des Harnstoffes.

Die Thätigkeit der Torula oder des Micrococcus ureae ist, wie man gefunden hat, auf ein lösliches Enzym zurückzuführen, das unter gewissen Umständen aus den Zellen ausgezogen werden kann. Das Enzym, das den Namen Urease erhalten hat, wurde zuerst von *Musculus* im Jahre 1874 beschrieben. Filtrierte man den Urin, der in kräftiger ammoniakalischer Gärung stand, durch feines Filtrierpapier, wusch und trocknete letzteres sorgfältig, so war man imstande, durch Eintauchen von Stücken des Filtrierpapieres in neutrale Harnlösungen eine ähnliche Gärung hervorzurufen. *Musculus* verfolgte den Verlauf der Gärung, indem er das Filtrierpapier mit Curcuma färbte. Nach kurzer Zeit wurde das Papier in der Harnlösung infolge der Alkalinität der Flüssigkeit braun. Das gleiche Ergebnis

Digitized by Google

wurde erhalten, nachdem das Papier vor der Färbung mit Curcumatinktur mit starkem Alkohol behandelt worden war. Bei dieser Behandlung konnte die Gärung nicht auf lebende Zellen zurückgeführt werden, da diese die Benetzung mit Alkohol nicht überlebt hätten. In einer folgenden, im Jahre 1876 veröffentlichten Abhandlung beschreibt *Musculus* die Darstellung des Enzyms aus einem stark alkalischen Harn, den er aus einer pathologischen Sekretion erhielt. Er fügte diesem Harn Alkohol im Überschufs zu und erhielt einen zähen Niederschlag, der in der Hauptsache aus Schleim bestand, der von der Wand der Blase herrührte. Wurde dieser Niederschlag abfiltriert und getrocknet, so lieferte er mit Wasser eine äufserst wirksame Enzymlösung. Die Lösung gab mit Alkohol einen amorphen Niederschlag, der den Harnstoff zersetzte. Die Quelle des Enzyms war in diesem Falle scheinbar der alkalische Urin, denn *Musculus* stellte fest, dafs sein schleimiger Urin keine Mikrobenzellen enthielt. Dies beweist jedoch nicht, dafs das Enzym anderen Ursprunges ist, denn sie können ja in der Blase unter den bestandenen pathologischen Bedingungen vorhanden gewesen sein.

Musculus fand, dafs das Enzym beim Ansäuern der Lösung rasch zerstört wurde.

Das Verhalten des Mikrokokkus machte *Sheridan Lea* im Jahre 1885 zum Gegenstand ausgedehnter Untersuchungen. Er kultivierte den Organismus so lange in Urin, bis er eine grofse Menge davon erhalten hatte und gofs das Ganze in einen Überschufs von Alkohol. Es fiel ein reichlicher Niederschlag aus, der zum Teil aus dem Organismus, zum Teil aus Mineralstoffen und anderen im Harn enthaltenen Stoffen und dem bereits im Harn vorhandenen Sediment bestand. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Alkohol ausgewaschen und getrocknet. Eine kleine Menge desselben gab, mit einer 2 prozentigen neutralen Harnstofflösung gemischt und bei 38° C. gehalten, in einigen Minuten eine stark alkalische Reaktion, der ganz bald ein starker Ammoniakgeruch folgte.

Dann wurde ein Teil des Niederschlages mit Wasser extrahiert und filtriert. Die Reaktion des Filtrates war ganz schwach alkalisch, die Flüssigkeit war klar und durchsichtig. Setzte man

Digitized by Google

etwas von dieser Flüssigkeit der bei dem ersten Versuch benutzten Harnstofflösung zu, so traten die nämlichen Erscheinungen auf. Der Alkoholniederschlag enthielt hiernach ein Enzym, das Harnstoff hydrolysierte und das durch Behandeln des Niederschlages mit Wasser herausgelöst werden konnte.

Lea behauptet, das Enzym durch mehrfaches Lösen und Fällen mit Alkohol in einem fast reinen Zustand erhalten zu haben. Diese Behandlung entfernt nach und nach die neben dem Enzym vorhandenen Salze. In diesem Zustand war es ein weifses, amorphes Pulver, das sich in destilliertem Wasser klar löste, das jedoch bei der Prüfung mit Salpetersäure und Ammoniak stets noch eine Spur Eiweifs aufwies.

Lea's Ergebnisse bestätigen und erweitern die von *Musculus* insofern, als er zeigt, dafs das Enzym aus den Zellen des Mikrokokkus dargestellt werden kann. *Musculus* behauptete auf Grund seiner Versuche, es seien keine Zellen vorhanden, der schleimige Urin sei vielmehr selbst die Quelle des von ihm erhaltenen Enzyms gewesen.

Lea machte auch noch weitere Versuche, um festzustellen, ob das Enzym von dem Mikrokokkus in den Urin abgeschieden wird, oder ob die normale Wirkung intracellular ist. *Musculus* Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dafs das Enzym von dem Organismus in der Blase abgesondert wird, da es kaum wahrscheinlich ist, dafs es von dem Gewebe der Blase gebildet wird.

Bei diesen Versuchen filtrierte *Lea* eine Probe gärkräftigen Urins, bis er frei von Sediment war. Die Organismen blieben auf dem Filter; zum Filtrieren wurde sehr feines Filtrierpapier in 12—15facher Schicht benutzt. Die Filtration wurde so lange fortgesetzt, bis unter dem Mikroskop keine Mikrokokken mehr zu sehen waren. Das vollkommen klare Filtrat wurde dann mit sehr verdünnter Essigsäure neutralisiert; die Flüssigkeit brauste auf, die darin verbleibende Kohlensäure wurde im Vakuum entfernt. Dann wurden zu einer abgemessenen Menge des Filtrates 2% Harnstoff zugesetzt und das Ganze in ein Wasserbad von 38° gesetzt. Eine Kontrollprobe enthielt die gleiche Menge Filtrat ohne Harnstoffzusatz; sie wurde in dasselbe Wasserbad neben die Hauptprobe gestellt.

Digitized by Google

Beide Flüssigkeiten blieben selbst nach 6 Stunden noch neutral.

Bei anderen Versuchen entfernte *Lea* die Organismen aus dem Urin durch Filtrieren durch Thon; auch in diesem Falle war der Urin frei von Enzym.

Eine weitere Menge ähnlichen Urins wurde gefiltert, bis er von Zellen frei war, und dann mit einem Überschufs von Alkohol gefällt. Der entstehende Niederschlag war in Wasser löslich, die Lösung besafs jedoch keine Wirkung auf Harnstofflösung.

Lea konnte also auf diese Weise den Nachweis nicht erbringen, dafs das Enzym von den Zellen des Organismus ausgeschieden wird, und er kam zu dem Schlufs, dafs seine Wirkung ausschliefslich intracellular sei. Dieses Ergebnis stand nicht im Einklang mit dem von *Musculus*. Nur auf zweierlei Weise liefsen sich die entgegengesetzten Anschauungen versöhnen. Entweder mufste *Musculus'* Urin Zellen enthalten haben, die seiner Beobachtung entgingen, oder die Ausscheidung aus den Organismen bei *Leas* Versuchen war nur gering, und die kleine Menge Enzym wurde bei der Fällung durch den Alkohol zerstört. Eine andere Erklärung konnte es kaum geben.

Lea kam zu dem Schlufs, dafs das Enzym die lebende Zelle wegen der diese umgebenden Zellhaut nicht verlassen könne.

Wurde der Organismus durch Alkohol getötet und sein Protoplasma in einem gewissen Grade durch die Wirkung des Reagenses zersetzt, dann konnte das Enzym durch Wasser ausgezogen werden.

Diese Erklärung jedoch läfst uns in mancher Beziehung im Ungewissen, da die Behandlung mit Alkohol nicht das ganze Enzym zerstört, ebensowenig die Zellwand verändert; es ist schwer verständlich, dafs die Enzyme die Zellwand nach dem Tode des Plasmas sollen passieren können, was zu Lebzeiten der Zelle nicht möglich war, wenn nicht der Tod den physikalischen Charakter der Zellmembran ändert. Es ist viel wahrscheinlicher, dafs das Enzym von dem lebenden Protoplasma sehr energisch zurückgehalten wird, so wie es *Buchner* für das Alkohol bildende Enzym nachgewiesen hat. Nach dem Tode des Protoplasmas läfst sich dieses bedeutend leichter ausziehen.

Miquel hat das Enzym aus 14 verschiedenen Arten von

Digitized by Google

Mikroorganismen ausgezogen, die bestimmte morphologische Eigenarten aufweisen und die alle imstande sind, ammoniakalische Gärung hervorzurufen. Er kultivierte sie in Peptonlösungen mit 2—3 g Ammoniumkarbonat im Liter. Vor der Impfung mit den Mikroben wurden die Lösungen durch Filtration durch Thonkerzen sterilisiert. Die Kulturen wurden so lange fortgesetzt, bis die ganze Flüssigkeit trübe geworden war. Die Peptonlösung enthielt alsdann eine gewisse Menge Enzym, das von den Mikroben ausgeschieden worden war. Bei seinen Versuchen erhielt *Miguel* genügend Enzym in einem Liter Peptonlösung, um damit 60 bis 80 g Harnstoff in weniger als einer Stunde in kohlensaures Ammoniak zu verwandeln.

Als günstigste Temperatur für die Wirkung der Urease fand *Miguel* 50—55° C., aber selbst bei dieser Temperatur wurde das Enzym allmählich zerstört. Bei einer Temperatur in der Nähe von 0° behielt die Ureaselösung ihre Wirksamkeit mehrere Wochen; bei 75° C. wurde sie in einigen Minuten, bei 80° C. fast sofort zerstört. Die Organismen selbst wurden nicht leicht getötet, sie überdauerten 2—3 Stunden eine feuchte Temperatur von 95° C. *Lea* fand, dafs sein Urease-Präparat beim Erhitzen auf 80—85° C. zerstört wurde.

Bufalini fand, dafs die Urease nicht nur Harnstoff und Hippursäure zersetzt, sondern auch Asparagin in Bernsteinsäure verwandelt.

Schmiedeburg fand ein Enzym in der Schweineniere, das sich, wie er angiebt, bei der Spaltung der Hippursäure beteiligte. Er gab ihm den Namen Histozym. Ob dieses mit der Urease identisch ist, ist zur Zeit noch nicht festgestellt, obgleich dies nicht unwahrscheinlich erscheint, wenn wir uns daran erinnern, dafs *van Tieghem* nachwies, dafs der Micrococcus ureae die Hippursäure hydrolysieren kann.

Digitized by Google

Kapitel XIX.

Oxydasen oder oxydierende Enzyme.

Die bislang betrachteten Enzyme wirkten im allgemeinen hydrolytisch; d. h. sie zersetzten die von ihnen angegriffenen Körper nach erfolgter Einführung von Wasser ins Molekül. Dies ist zweifellos für die Enzyme, die bei den Ernährungsvorgängen, sowohl der Tiere als auch der Pflanzen, eine Rolle spielen, festgestellt. Ob die proteolytischen Enzyme ebenfalls in diesem Sinn wirken, ist noch nicht ganz klargestellt, wie dies bei den kohlenhydratspaltenden Enzymen der Fall ist, doch ist die Annahme nicht ganz unbegründet. Die Reaktion ist allem Anschein nach bei den Gerinnungsenzymen verwickelter, über deren Wirkungsweise wir einstweilen noch im Unklaren sind.

Einige der bislang betrachteten Zersetzungsvorgänge scheinen zur Hydrolyse in keinen Beziehungen zu stehen, hauptsächlich die Wirkung des Myrosins, und später werden wir noch sehen, dafs das Alkohol bildende Enzym ebenfalls keine Hydrolyse einleitet.

In den letzten Jahren hat sich eine andere Klasse von Enzymen aufgethan, die alle direkt oxydierend wirken und zwar auf verschiedene Körper, darunter verschiedene aromatische Substanzen und Zucker. Die Enzyme haben den Namen Oxydasen erhalten; sie sind ziemlich weit verbreitet und kommen sowohl im Tier-, als auch im Pflanzenkörper vor.

Laccase.

Von den Oxydasen kannte man am ersten die Laccase, das Enzym, das bei der Bildung des Lackes aus dem rohen Saft des Lackbaumes Südost-Asiens eine Rolle spielt.

Digitized by Google

Das Vorkommen dieser Oxydase wurde zuerst im Jahre 1883 von dem Japanesen *Yoshida* festgesteilt, der die Rinde dieses Baumes untersuchte und zuerst die Vorgänge erkannte, die sich bei der Bildung des Lackes abspielen.

Der Rohsaft wird durch Schnitte in den Stamm mehrerer Rhusarten erhalten; der Saft fliefst aus und wird gesammelt. Er sieht nahezu weifsrahmig aus und riecht schwach nach Buttersäure. Bei Luftzutritt wechselt er rasch die Farbe, wird braun und schliefslich schwarz. Auf eine glatte Oberfläche gestrichen trocknet er mit schwarzem Glanze ein. Mit dem Saft läfst sich nur sehr schwer experimentieren, da er die Haut stark reizt und schmerzhafte Ausschläge und Wunden erzeugt.

Nach *Yoshida* besteht der Saft, der den Namen Urushi führt, zum gröfsten Teil aus einer besonderen Säure, die er Urushisäure nannte, und der er die Formel $C_{14}H_{18}O_2$ beilegte. Nach geeigneten Methoden aus den rohen Milchsaft dargestellt und bei 110° getrocknet, bildet sie eine dunkle, teigige Substanz, die nach dem ursprünglichen Saft riecht; sie ist löslich in Benzol, Äther, Alkohol und Kohlensäure, aber unlöslich in Wasser, sie hat bei 23° C. ein spezifisches Gewicht von 0,9851. Bei Luftzutritt trocknet sie nicht und weist auch nicht solche Veränderungen auf wie der ursprüngliche Milchsaft.

Aufser Urushisäure enthält der Rohsaft eine gewisse Menge Gummi und eine wechselnde Menge, etwa 3—8% eines besonderen stickstoffhaltigen Körpers, der beim Erhitzen auf 63° gerinnt. Wird der Milchsaft mit einem Überschufs von Alkohol behandelt, so fallen der Gummi und der stickstoffhaltige Körper aus. Nach der Filtration können diese beiden Körper durch Behandeln mit kaltem Wasser getrennt werden; der Stickstoffkörper löst sich darin, während das Gummi nur quillt.

Das Enzym ist mit dem Stickstoffkörper des Saftes vergesellschaftet. Wird eine Lösung desselben mit einer kleinen Menge freier Urushisäure gemischt, so wird letztere unter gewissen Bedingungen in Lack verwandelt. Diese Umwandlung findet bei einem Erwärmen der Lösung auf 63° C. nicht mehr statt.

Die Natur des Stickstoffkörpers ist nicht genau erforscht, doch scheint er sich von den Eiweifsstoffen wesentlich zu unterscheiden, indem er weniger Stickstoff und mehr Kohlenstoff ent-

Digitized by Google

hielt. *Yoshidas* Analyse ergab in 100 Teilen 63,44 Teile Kohlenstoff, 7,41 Teile Wasserstoff, 4,01 Teile Stickstoff, 22,04 Teile Sauerstoff und 1,2 Teile Asche.

Auf Grund seiner Versuche kam *Yoshida* zu dem Schlufs, dafs der Urushisaft im wesentlichen aus vier Substanzen besteht, nämlich Urushisäure, Gummi, Wasser und einem besondern Enzym. Sein Eintrocknungsvermögen ist auf die Oxydation der Urushisäure zurückzuführen. Diese Säure, $C_{14}H_{18}O_2$ geht dabei in Oxy-Urushisäure, $C_{14}H_{18}O_3$ über; die Oxydation ist auf die Wirkung des Enzyms bei Gegenwart von Sauerstoff und Wasser zurückzuführen.

Er unterstützt diese Schlufsfolgerung durch zwei Versuchsreihen, die hier kurz mitgeteilt sein mögen.

Eine kleine Menge des ursprünglichen Saftes wurde in einen bedeckten Becher gebracht und auf dem Wasserbad erhitzt und zwar auf verschiedene Temperaturen; dann wurde der Saft dünn auf eine Glasplatte gestrichen und in einem Kasten bei Zutritt von feuchter Luft bei 20° C. zum Trocknen hingestellt. Die Erhitzung des Saftes dauerte in jedem Falle $3^1/_2$—4 Stunden.

Es ergab sich folgendes:

Der Saft war erhitzt auf:	Zeitdauer bis zum Trocknen
20° C.	2 Stunden
30° C.	4 "
40° C.	$4^1/_2$ "
55—59° C.	24 "
60—64° C.	Trocknete überhaupt nicht.

In einer zweiten Versuchsreihe stellte er fest, dafs der Milchsaft nicht trocknete, wenn keine Feuchtigkeit zugegen war, dafs er in feuchter Luft in 24 Stunden, in feuchtem Sauerstoff in 2 Stunden, in feuchtem Wasserstoff und Stickstoff in 36 Stunden und in feuchter Kohlensäure erst nach 2 Tagen trocknete.

Es folgt aus diesen Versuchen, dafs das Enzym am energischsten bei einer Temperatur von 20° C. wirkt, aber nur dann, wenn Sauerstoff und Feuchtigkeit zugegen sind; Temperaturen über 20° sind ihm schädlich, und bei 60—63° C. wird es zerstört. Es mag daran erinnert werden, dafs bei dieser Temperatur der stickstoffhaltige Bestandteil des Saftes koaguliert.

Digitized by Google

Yoshida stellte auch Oxy-Urushisäure durch Oxydation der Urushisäure mit starker Chromsäure dar. Er giebt an, dafs sie, auf diese Weise dargestellt, alle Eigenschaften des Lackfirnisses aufweist.

Der Name Laccase wurde dem Enzym mehr als 10 Jahre später von *Bertrand* beigelegt, der sich weiter mit der Untersuchung des Enzyms befafste und mehrere neue Eigenschaften desselben entdeckte.

In der Hauptsache bestätigte er die Angaben von *Yoshida* in betreff der Bestandteile des Milchsaftes. Den als Urushisäure bezeichneten Körper benennt er Laccol; er hat ihn aber nicht näher auf seine zerstörenden Eigenschaften untersucht.

Er stellte das Enzym durch Behandeln des Saftes mit grofsen Mengen Alkohol dar; dieser fällte eine Gummisubstanz, die er durch wiederholtes Wiederauflösen und Fällen mit Alkohol reinigte. Sie schied sich in weifsen undurchsichtigen Flocken ab, die bei der Hydrolyse Galaktose und Arabinose lieferten.

Das Enzym wurde aus dem Gummi durch Behandeln mit kaltem Wasser ausgezogen.

Im natürlichen Saft besteht das Laccol in der Form einer Emulsion, die hauptsächlich auf die Gegenwart des Gummis zurückzuführen ist.

Das Laccol verändert sich nicht, wenn es durch Lösen in Alkohol von dem Saft getrennt und unter Luftabschlufs aufbewahrt wird. Auf Zusatz von etwas Wasser zur alkoholischen Lösung entsteht eine weifse Emulsion, die sich längere Zeit unverändert hält; nimmt man jedoch an Stelle des Wassers eine Lösung von Laccase, so wird die entstehende Emulsion sofort braun und schwarz, besonders bei Luftzutritt. Eine gekochte Laccaselösung bewirkt eine derartige Veränderung nicht.

Soweit *Bertrand* die Eigenschaften des Laccols erforscht hat, scheint es gewissen vielatomigen Phenolen verwandt zu sein. Aus diesem Grunde hat er die Wirkung der Laccase auf mehrere dieser Phenole geprüft, besonders auf Hydrochinon und Pyrogallol. Wird Hydrochinon der Wirkung der Laccase unterworfen, so wird seine Lösung rasch rosenrot, und nach kurzer Zeit scheiden sich krystallinische Schuppen von grünem metallischem Glanze aus, deren Menge rasch zunimmt. Wird dieser Prozefs in einem

Digitized by Google

verschlossenen Rohr durchgeführt, so wird der vorhandene Sauerstoff fast ganz absorbiert. Die Flüssigkeit nimmt einen strengen charakteristischen Geruch an, und nach Entfernung der darin enthaltenen festen Substanzen kann daraus durch Schütteln mit Äther Chinon gewonnen werden. Der Niederschlag ist Chinhydron.

Bei Abwesenheit von Laccase absorbiert das Hydrochinon keinen Sauerstoff, verändert sich überhaupt nicht. Das Hydrochinon wird also vom freien Sauerstoff unter der Mitwirkung der Laccase zu Chinon oxydiert nach der Gleichung:

$$2C_6H_4(OH)_2 + O_2 = 2H_2O + 2C_6H_4O_2.$$

Das dabei entstehende Chinon verändert die Farbe der Flüssigkeit. Ein Teil des Chinons verbindet sich mit dem Rest des nicht oxydierten Hydrochinons zu dem sich in Krystallen abscheidenden, viel weniger löslichen Chinhydron.

Bei Benutzung von Pyrogallol an Stelle des Hydrochinons erhält man ähnliche Ergebnisse; es scheidet sich dabei Purpurogallin in Form eines Pulvers aus; dieses sublimiert beim Erhitzen zu orangeroten Nadeln, die in Alkohol und Essigsäure löslich sind.

Laccase greift auch noch andere Polyphenole an, hauptsächlich aber solche, deren Hydroxylgruppen sich in der Ortho- oder Parastellung befinden. Die entsprechenden Meta-Verbindungen werden nur schwierig angegriffen. Die Oxydierbarkeit dieser Körper durch Laccase scheint von der Leichtigkeit, mit der sie in Chinone überzuführen sind, abzuhängen. Die Monophenole werden von dem Enzym nicht angegriffen, wohl aber Gallussäure und Tannin.

Bertrands Beobachtungen über das Verhalten der Laccase gegenüber verschiedenen Temperaturen stimmen mit denen *Yoshidas* nicht überein; er findet, dafs sie bei 70° C. noch wirksam ist.

Bertrand hat nach der Laccase auch noch in verschiedenen anderen Pflanzen mit Erfolg gesucht; er meint, das Enzym sei sehr weit verbreitet. Bei seinen Versuchen benutzte er die Guajakreaktion. Das war aber kein glücklicher Gedanke, denn sehr viele Forscher fanden, dafs sie keine befriedigenden Ergebnisse liefert. Er behauptet, dafs eine alkoholische Lösung von Guajakharz bei Gegenwart von Luft und etwas Laccase blau wird; ist viel Laccase vorhanden, so geht die blaue Farbe in Grün und

Digitized by Google

dann in Gelb über. In den meisten Fällen aber hat er das Enzym isoliert und seine Gegenwart aus seiner Wirkung bewiesen. Und dies ist auch in der That die einzige zulässige Methode. Durch Kombination dieser beiden Methoden stellte er die Gegenwart der Laccase in den roten, gelben und weifsen Rüben fest, ferner in den Kartoffelknollen und der Erdartischocke, in den knolligen Wurzeln von Dahlia, in gewissen Rhizomen, in den Äpfeln, Birnen, Quitten und Kastanien, in den vegetativen Teilen der Luzerne, des Klees, des Lolchs und des Spargels, sowie in den Blüten der Gardenia. Sie kann aus diesen Pflanzenteilen durch Extraktion mit Wasser und Fällen mit Alkohol gewonnen werden. Der Auszug aus grünen Geweben mufs mit Chloroform gesättigt und 24 Stunden zur Entfernung der färbenden Substanzstehen gelassen werden; dann kann die Fällung mit Alkohol vorgenommen werden.

Rey-Pailharde fand die Laccase im keimenden Samen, besonders der Leguminosen.

Die Wirksamkeit der Laccase scheint in gewissem Zusammenhang zu stehen mit der Gegenwart von Mangan. Ihre Asche enthält stets Spuren eines Oxydes dieses Metalles, manchmal über 2 %. *Bertrand* behauptet, dafs die Wirksamkeit eines Präparates des Enzyms dem Gehalte desselben an Mangan proportional sei. Das Präparat aus Luzerne ist arm an diesem Bestandteil; gerade deswegen kann an diesem Präparat die Wirkung des Zusatzes eines Mangansalzes gut studiert werden. *Bertrand* beschreibt in dieser Beziehung einen typischen Versuch. Er sammelte zur Zeit der Blüte mehrere Kilogramm Luzerne, zerkleinerte sie im Mörser, prefste den Saft aus, der mit Chloroform gesättigt und 24 Stunden im Dunkeln stehen gelassen wurde. Der Saft wurde dann filtriert und die Laccase durch Zusatz von $2^1/_2$ Volumen Alkohol ausgefällt. Der Niederschlag wurde in wenig Wasser aufgenommen, die Lösung filtriert und die Laccase abermals durch Zusatz eines grofsen Überschusses Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde zum Schlufs abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Er enthielt nur eine Spur Mangan.

Zu 50 ccm einer Lösung von Hydrochinon gab man 0,1 g dieser Fällung und beliefs dann das Ganze 24 Stunden an der Luft unter öfterem Umschwenken. Es trat nur eine rötliche

Digitized by Google

Färbung auf. Weitere 50 ccm der Hydrochinonlösung wurden mit 0,1 g Laccase und 0,001 g Mangan in der Form von schwefelsaurem Mangan versetzt: in weniger als zwei Stunden schieden sich Krystalle des Chinhydrons aus. Im letzteren Falle fand offenbar eine Oxydation statt, und zwar in weitgehenderem Maſse als in 24 Stunden ohne Manganzusatz.

Stellte man den Versuch so an, daſs der absorbierte Sauerstoff gemessen werden konnte, so ergab sich, daſs nach 6stündigem Bewegen mit Luft bei 15° C. die Lösung, die nur Laccase enthielt, 0,2 ccm Sauerstoff aufnahm; bei Gegenwart von Mangansalz allein wurden 0,3 ccm Sauerstoff aufgenommen; waren aber beide vorhanden, so betrug die aufgenommene Sauerstoffmenge 6,3 ccm.

Wie man hieraus sieht, spielt das Mangan bei der gewöhnlichen Wirkung des Enzyms eine sehr wichtige Rolle. Kein anderes Metall war imstande, es zu ersetzen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde gefunden, daſs verschiedene Mangansalze ein gewisses Vermögen besitzen, die Oxydation des Hydrochinons zu vermitteln; das Oxydul schien dabei als Sauerstoffüberträger zu wirken. Ein Vergleich der Wirkung dieser Mangansalze mit der vereinigten Wirkung von Mangan und Laccase führte *Bertrand* zu der Theorie, daſs die Oxydasen als Verbindungen von Mangan mit gewissen eiweiſsartigen Stoffen aufzufassen seien, die ein Säureradikal enthalten, welch letzteres mit den verschiedenen Enzymen wechselt. In solchen Verbindungen besitzt das Säureradikal gerade die nötige Affinität, um das Metall in Lösung zu halten. Nach *Bertrands* Meinung ist der Sauerstoffüberträger das Mangan, während der Eiweiſsstoff der Oxydase ihre anderweitigen Charaktere verleiht, wie sie sich in dem Verhalten gegen Hitze und die zu ihrer Identifizierung benutzten Reagentien kundgeben.

Ob diese Hypothesen stichhaltig sind oder nicht — die Versuche zeigen, daſs die Laccase auf jeden Fall in ihrer Wirkung in hohem Maſse durch die Gegenwart des Magans unterstützt wird, wenn sie nicht gänzlich von ihrer Verbindung mit diesem Metall in irgend einer Form abhängig ist.

Auſser in den bereits erwähnten Pflanzen scheint die Laccase in einer ganzen Anzahl von Pilzen vorzukommen. In diesen Pflanzen sind die Oxydationserscheinungen sehr augenfällig, und

Digitized by Google

dies veranlafste im Jahre 1896 *Bourquelot* und *Bertrand*, in eine Untersuchung derselben einzutreten, mit der ausgesprochenen Absicht, festzustellen, ob Laccase oder ein ähnliches Enzym in ihrem Stoffwechsel eine Rolle spiele. Wie auch in anderen Fällen, legten die Forscher hohen Wert auf die Guajak-Reaktion; sie fanden, dafs der aus vielen Pilzen ausgeprefste Saft die Guajaktinktur sehr rasch unter Blaufärbung oxydiert, was bei vorherigem Aufkochen nicht der Fall ist.

Die Reaktionen des Prefssaftes mit anderen Substanzen aufser der Guajaktinktur liefsen keinen Zweifel darüber, dafs er dasselbe wirksame Prinzip enthält wie der Saft des Lackbaumes. Er färbt das aus dem Milchsaft von Rhus dargestellte Laccol; er liefert bei der Einwirkung auf Pyrogallol Krystalle von Purpurogallin, bildet aus Hydrochinon Chinon und Chinhydron und giebt mit Gallussäure eine deutliche braune Farbe.

Sehr leicht gewinnt man die Laccase aus Russula foetens Pers., einem Basidiomyceten, der im Sommer sich häufig in den Wäldern findet. 125 g dieses Pilzes mit demselben Gewicht Chloroformwasser extrahiert, lieferte 60 ccm einer anfänglich schwachgelben, beim Stehen an der Luft allmählich rot werdenden Flüssigkeit. Bei der Einwirkung auf Gallussäure in einer verschlossenen Flasche wurde beim Schütteln der Sauerstoff allmählich absorbiert, wobei in den ersten Stunden 15 ccm dieses Gases aufgenommen wurden. Sie gab auch mit Laccol, Pyrogallol etc. die bereits beschriebenen Reaktionen.

Wurde der so dargestellte Saft vorher aufgekocht, so verlor er seine enzymatische Wirksamkeit. *Bourquelot* und *Bertrand* behaupten jedoch, dafs er in dieser Beziehung widerstandsfähiger sei als alle übrigen Enzyme und dafs man zur völligen Zerstörung kurze Zeit kochen müsse.

Beim Eingiefsen des Russula-Auszuges in überschüssigen Alkohol bildet sich nur ein geringer Niederschlag, der bei der Behandlung mit Wasser an dieses das Enzym abgiebt. Bei diesem Verfahren ist jedoch die Fällung der Laccase aus dem Auszug nicht vollständig.

Unter der grofsen Anzahl der auf diese Weise untersuchten Pilze, die hauptsächlich zur Gruppe der Basidiomyceten gehörten, enthielt mehr als die Hälfte Laccase, die auf die aromatischen

Digitized by Google

Körper in der beschriebenen Weise einwirkte. Unter diesen Pilzen sind die Genera Russula, Lactarius, Boletus und Psalliota am bemerkenswertesten.

Die Gasteromyceten enthalten in der Regel nur wenig davon, wenn überhaupt etwas, die Ascomyceten und Myxomyceten sind, soweit sie geprüft wurden, frei von dem Enzym.

Aufser der Wirkung der Laccase auf die aromatischen Körper, beobachteten *Bourquelot* und *Bertrand* noch die Farben-Veränderungen, die beim Zerschneiden der fleischigen Pilze sich auf der Schnittfläche bei Luftzutritt bemerkbar machen. Das Gewebe von Boletus ändert sich fast augenblicklich, es wird blau, wobei die Schnelligkeit des Verfärbens und der Grad des Farbentones bei verschiedenen Arten wechseln. Lactarius wird beim Zerschneiden violett, während Russula erst rot und dann schwarz wird.

Über diese Farbenveränderungen herrschen verschiedene Ansichten. *Schönbein* beobachtete die Erscheinung schon vor dem Jahre 1856 und schrieb sie der Wirkung des Ozons auf ein besonderes Chromogen in den Pilzen zu, wobei er der Ansicht war, dafs letztere auch eine Substanz enthalten, die den Sauerstoff der Luft in Ozon zu verwandeln vermag. Im Jahre 1872 unternahm *Ludwig* Untersuchungen über den Gegenstand und äufserte in Bezug auf das Vorhandensein eines besonderen Chromogens im Pilzgewebe dieselbe Ansicht wie *Schönbein.*

Auf Grund neuerer Untersuchungen über die Oxydasen kamen *Bourquelot* und *Bertrand* zu der Ansicht, dafs eine Oxydase bei der Veränderung des Chromogens in Frage kommt. Nach *Schönbein* kam aufser dem Chromogen offenbar noch etwas anderes in Betracht, nämlich die Bildung von Ozon aus Sauerstoff. Welcher Bestandteil diese Umwandlung auch immer bewirken mochte, jedenfalls steht der Sauerstoff der Luft mit der Oxydation des Chromogens im Zusammenhang. Da diese Rolle bei der Bildung des Lackes die Laccase spielt, so erscheint es wahrscheinlich, dafs *Schönbeins* hypothetischer Sauerstoff-Umbildner in Wirklichkeit ein Oxydations-Enzym war.

Auf dieser Basis führten *Bourquelot* und *Bertrand* folgenden Versuch aus:

Boletus cyanescens wurde mit kochendem 95 prozentigem

Digitized by Google

Alkohol extrahiert, wobei der Pilz möglichst unter Luftabschlufs gehalten wurde. Nach einer viertelstündigen Extraktion wurde die Flüssigkeit abgekühlt und filtriert. Der alkoholische Auszug war schwach gelb gefärbt und enthielt die Substanz, die sich gewöhnlich bei Luftzutritt blau färbt. So dargestellt, behielt er seine Farbe längere Zeit, selbst wenn er verdünnt wurde und mit der Luft in Berührung gelassen wurde.

Die Forscher fügten zu einem derartigen Auszug, der mit Wasser aufs Doppelte verdünnt wurde, eine kleine Menge des Auszuges aus Russula. In einer halben Minute trat eine Rotfärbung auf, die bald in blau überging. Dieselbe Wirkung wurde erzielt auf Zusatz von etwas Laccase, die aus dem Milchsaft des Lackbaumes gewonnen worden war. Wurde das Enzym vorsichtig, ohne umzuschütteln, zugesetzt, so trat die Verfärbung nur allmählich auf; die obersten, mit der Luft in Berührung befindlichen Schichten färbten sich zuerst, von da aus erfolgte die Verfärbung durch die ganze Flüssigkeit hindurch.

Hieraus schliefsen *Bourquelot* und *Bertrand*, dafs die Oxydase, die diese Veränderungen hervorbringt, mit der Laccase von Rhus und anderer Pflanzen identisch ist und dafs sie neben ihrer Wirkung auf aromatische Körper, wie Hydrochinon und Pyrogallol auch die Oxydation des Chromogens der Pilze vermittelt, hauptsächlich solcher, die eine blaue oder rote Farbe liefern. Die Laccase kommt in den Pilzen neben dem Chromogen vor; wird der Saft jedoch gekocht, dann wird das Enzym getötet und das Chromogen bleibt infolgedessen unverändert.

Ein der Laccase in vieler Beziehung ähnliches Enzym wurde von *Piéri* und *Portier* beschrieben; sie fanden es in den Kiemen, den Mundfühlern und im Blut gewisser Mollusken.

Tyrosinase.

In anderen Pilzen kommen verschiedene Chromogene vor, die sich beim Stehen an der Luft nicht blau färben, sondern rot und schliefslich schwarz werden. Unter diesen ist am auffälligsten Russula nigricans Bull. Die die Schwarzfärbung veranlassende Substanz ist in Alkohol fast unlöslich, nach dem Kochen des Pilzes mit Alkohol, kann sie durch darauffolgende Behandlung mit kochendem Wasser aus dem Rückstand aus-

Digitized by Google

gezogen werden. Wird ein solcher Auszug mit einem frischen Wasserauszug des Pilzes behandelt, oder giebt man ein Stück des Pilzgewebes hinzu, so wird die Flüssigkeit rot und nach einiger Zeit schwarz. Wird das Chromogen aus dem Pilz mit kochendem Wasser extrahiert, rasch ausgeprefst, der Prefssaft filtriert und auf eine kleine Menge eingedampft, so scheiden sich farblose, nadelförmige Krystalle aus, die gewöhnlich in Kugelgebilden angeordnet sind. Sie sind in Alkohol unlöslich, schwer löslich in kaltem, leicht löslich in heifsem Wasser. Sie wurden von *Bertrand* mit dem Tyrosin identifiziert.

Genau dasselbe fand *Bertrand* beim ausgeprefsten Saft der roten Rüben, den knolligen Wurzeln von Dahlia und den Kartoffelknollen; auch hier fand er Tyrosin in den Geweben.

Die Ähnlichkeit der beobachteten Erscheinungen mit den bei *Boletus, Lactarius* u. s. w. beobachteten deutet auf eine ähnliche Ursache der Farbenveränderung. Die Laccase kann jedoch keine Verfärbung nach Schwarz bewirken, ebensowenig wie dies einfache Oxydationsmittel vermögen. *Bertrand* behauptet, dafs die Schwarzfärbung ein von einer besonderen Oxydase vermittelter Oxydationsprozefs sei; sie nannten das in Frage kommende Enzym *Tyrosinase.*

Fügt man etwas Kaltwasserauszug aus Russula nigricans zu einer Lösung von Tyrosin, so wird das Gemisch zuerst rot, dann tintenschwarz, schliefslich scheidet sich ein amorpher schwarzer Niederschlag aus. Führt man diesen Versuch in einem Glasgefäfs, ohne umzurühren, aus, so tritt die Verfärbung zumeist an der Oberfläche der Flüssigkeit auf. Bei Luftabschlufs findet kein Farbenumschlag statt, ebenso nicht, wenn der Pilzauszug vor der Zugabe zur Tyrosinlösung aufgekocht wurde. In einem geschlossenen Gefäfs bei Gegenwart von Luft kann die Absorption des Sauerstoffs gleichzeitig mit dem Schwarzwerden der Flüssigkeit gemessen werden.

Tyrosinase läfst sich nicht nur aus Russula, sondern auch aus Dahlia und aus der roten Rübe ausziehen. Die Tyrosinase aus allen drei Quellen verhält sich gegen das Tyrosin in gleicher Weise. Russula scheint sie in der gröfsten Menge zu enthalten. Die Methode der Extraktion ist in allen Fällen die gleiche.

In einigen Arten von Russula kommen die beiden bislang

Digitized by Google

besprochenen Oxydasen nebeneinander vor. *Bertrand* hat sie nach folgender Methode von einander getrennt: Anderthalb Kilogramm frisch gesammelter *Russula delica* Fries. wurden zu Brei gestofsen und $1^1/_2$ Stunde mit dem gleichen Gewicht Chloroformwasser bei gewöhnlicher Temperatur eingeteigt. Beim Auspressen erhielt man etwa 2 l einer schleimigen Flüssigkeit, die mit 3 l 95 prozentigem Alkohol versetzt wurden. Der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde auf $^1/_2$ l durch Destillation im Vakuum konzentriert; in diesem Zustand wirkte es sehr kräftig auf Pyrogallol und Hydrochinon, war jedoch ohne Wirkung auf Tyrosin; die Flüssigkeit enthielt also nur Laccase.

Der Niederschlag wurde mit 200 ccm Chloroformwasser gewaschen; er war aufgequollen und bildete eine Halblösung, die mit 400 ccm Alkohol gefällt wurde; die Fällung wurde trocken abgeprefst. Durch eine wiederholte derartige Behandlung wurde sie gereinigt. Bei 33° C. getrocknet ergaben sich auf diese Weise 7 g. Dieser Niederschlag gab nach mehrstündigem Behandeln mit Wasser an dieses eine Substanz ab, die leicht Tyrosin oxydierte, jedoch kaum Wirkung besafs auf Hydrochinon oder Pyrogallol.

Die Tyrosinase wird bei viel niedrigerer Temperatur zerstört als die Laccase; bei 50° C. wird sie schon geschädigt und geht bei höherer Temperatur rasch zu Grunde. Man kann aus dem Gemisch der beiden Oxydasen leicht Laccase erhalten, wenn man das Gemisch auf 70° C. erhitzt. Es oxydiert dann Hydrochinon, ist jedoch ohne Wirkung auf Tyrosin.

Bourquelot hat in vielen Pilzen Tyrosinase nachgewiesen, u. a. in *Boletus, Russula, Lactarius, Paxillus, Coprinus, Psalliota, Hebeloma, Pholiota, Collybia, Clitocybe, Tricholoma* und *Amanita;* in allen diesen ist sie mit der Laccase vergesellschaftet, in Amanita ist letztere aber in nur geringer Menge vorhanden.

Aufser dafs Tyrosinase Tyrosin oxydiert, wirkt sie noch auf alle Kresole, Resorcin, Guajakol, Metatoluidin, Xylidin, Ortho-, Meta- und Paraxylenol, Thymol, Carvacrol und α- und β-Naphtol.

Auffälligerweise wirkt sie auch noch in 50 prozentiger wässeriger Lösung von Äthyl- und Methylalkohol. Die Alkohole selbst werden von dem Enzym nicht verändert.

Digitized by Google

Oenoxydase.

Ein anderes oxydierendes Enzym spielt bei einer gewissen Weinkrankheit, dem sogenannten „Brechen“ der Weine eine Rolle. Nach *Bouffard* verliert ein derartig kranker Wein seine charakteristische Farbe, und nach 3—4 Stunden setzt er einen rotbraunen Bodensatz ab. Befindet sich der Wein in Ruhe, so beginnt die Verfärbung an der Oberfläche, wo sich eine dünne Haut von gefärbter Substanz bildet; die Verfärbung geht von da aus schichtenweise nach unten weiter, bis zum Schlufs die Wände des Gefäfses mit einer anhaftenden Substanz bedeckt und die Flüssigkeit fast farblos ist oder einen schwachgelben Farbenton angenommen hat. Die Ausscheidung rührt von der färbenden Substanz des Weines her und ist in konzentrierter Weinsäure unlöslich. Diese Veränderungen gehen ohne Gasentwickelung vor sich. *Bouffard* giebt an, dafs derartige Weine durch Erhitzen auf 60° C. oder durch Zugabe einer Spur Schwefelsäure vor der Krankheit geschützt werden können. Die Veränderungen werden nicht durch Bakterien bewirkt, denn sie werden durch Filtration durch poröses Porzellan nicht verhindert, auch nicht durch Zugabe von den Mikroben schädlichen Stoffen, z. B. Salicylsäure oder Sublimat.

Gouirand hat festgestellt, dafs diese Veränderungen durch eine Substanz bewirkt werden, die im Weine selbst enthalten ist. Er filtrierte einen kranken Wein durch Porzellan und erhielt auf Zusatz von Alkohol zum Filtrat einen flockigen Niederschlag. Eine kleine Menge dieses ausgewaschenen und getrockneten Niederschlages einem gesunden Weine zugefügt, rief in diesem rasch die Krankheit hervor.

Diese Substanz wird durch Erhitzen rasch zerstört. Bei einigen seiner Versuche behandelte *Gouirand* gesunde Weine mit einer kleinen Menge der Substanz; die eine Hälfte der Weine erhitzte er auf 80° C. Innerhalb 12—72 Stunden wurden die nicht erhitzten Proben krank, während die Kontrollproben unbegrenzt klar und durchsichtig blieben. Ein Erwärmen der Kontrollproben auf 60° C. gab unterschiedliche Resultate; bei einigen hindert es das „Brechen“, bei anderen verzögerte es das Umschlagen nur. Durch Erhitzen auf 50° C. wurde die Substanz nicht beeinflufst.

Digitized by Google

Wurden gesunde Weine in derselben Weise mit Alkohol gefällt wie die kranken, so besafs der Niederschlag nicht die Eigenschaft, Weine krank zu machen.

Martinand fand, dafs diese Substanz in reifen Trauben vorkommt. Ein Traubenauszug zeigt alle Reaktionen der Laccase; er oxydiert Hydrochinon, Pyrogallol u. s. w.; beim Erhitzen auf 100° C. verliert er jedoch diese Fähigkeit. Fügt man jedoch zu dem Auszug nach dem Abkühlen etwas von dem Niederschlag, der beim Behandeln von Traubensaft mit Alkohol gebildet wird, so erhält er diese Fähigkeit wieder. Es ist also in den Trauben sowohl, als auch in dem daraus hergestellten Wein eine gewisse Menge der oxydierenden Substanz vorhanden, die nach ihrem Verhalten in dieselbe Klasse wie die Laccase und Tyrosinase eingereiht werden mufs, nämlich unter die oxydierenden Enzyme.

Man gab diesem Körper den Namen Oenoxydase. Sie ähnelt der Laccase in vieler Beziehung, scheint mit ihr jedoch nicht identisch zu sein.

Martinand fand das Enzym auch noch in anderen Früchten aufser den Weintrauben, z. B. in den Pflaumen, Birnen und Äpfeln. Es scheint sich beim Reifen der Früchte zu entwickeln, denn unreife Trauben enthalten davon nur sehr wenig. Ein grofser Teil scheint in den ersten Stadien der Weinbereitung verloren zu gehen, denn der Wein selbst enthält davon nur sehr wenig im Vergleich zum frischen Traubenmost.

Martinand fand, dafs man die Oenoxydase aus dem Wein durch Schütteln mit Äther entfernen kann, der demselben einen Körper entzieht, der einige Eigenschaften des Gerbstoffes aufweist; er wird auf Zusatz von Eisenchlorid olivgrün oder gelbbraun, auf Zusatz von Alkalien rot und giebt mit Eiweifs, aber nicht mit Gelatine, einen weifsen Niederschlag. Nachdem der Wein oxydiert ist, geht der Körper gewöhnlich nicht mehr in den Äther, anderenfalls in nur sehr geringer Menge.

Ein in dieser Weise mit Äther behandelter und neutral gehaltener Wein unterliegt nicht der Selbstoxydation. Man kann daher annehmen, dafs das Enzym in dem Wein mit dem in Äther löslichen Körper vergesellschaftet ist.

Martinand fand, dafs die Oenoxydase bei 4 Minuten langem Erhitzen auf 72° C. zerstört wird; auch ein $1^1/_2$ stündiges Er-

Digitized by Google

hitzen auf 55° C. schädigt sie. Dazwischenliegende Temperaturen bewirken in der entsprechenden Zeit dieselben Schädigungen.

Bouffard fand, dafs die Temperatur, die das Enzym schädigt, unter gewissen Umständen sehr wechselt. Er fand, dafs Weine, die eben der Krankheit verfallen wollten, durch Erhitzen auf 60° C. erhalten blieben, während ein Erwärmen auf 55° C. sie gegen die Krankheit erheblich widerstandsfähig machte. Er fällte ferner normale Weine nach der Alkohol-Methode und daneben Proben desselben Weines, nachdem dieser auf 60° C. erhitzt worden war. Der im letzteren Falle gewonnene Niederschlag besafs keine oxydierende Kraft, während der aus nicht erhitztem Wein gewonnene sehr wirksam war. Weitere Untersuchungen zeigten, dafs die Natur des Mediums einen grofsen Einflufs auf die Zerstörung ausübte. Wurde das Enzym in wässeriger Lösung von neutraler Reaktion erhitzt, so widerstand es allen Temperaturen unter 72,5° C.; bei Gegenwart von 10% Alkohol jedoch oder 0,5% Weinsäure war die Zerstörung bei 52,5° C. vollkommen. Waren die doppelten Mengen Alkohol oder Weinsäure zugegen, so wurde die Zerstörungstemperatur um 5° C. herabgesetzt. *Bouffard* stimmt jedoch mit *Martinand* darin überein, dafs man das Enzym durch längeres Erhitzen in neutralem Medium auf 60° C. zerstören kann.

Was das Verhalten des Enzyms gegen verschiedene Reagentien anlangt, so wird es durch sehr verdünnte Schwefelsäure zerstört, schon durch 0,02 g auf das Liter Enzymlösung.

Cazeneuve extrahierte das Enzym aus krankem Beaujolaiswein und stellte seine Eigenschaften fest. Er fällte den Wein mit einem Überschufs starken Alkohols; der Niederschlag besafs gummiartige Beschaffenheit. Er nahm ihn mit Wasser auf, fällte ihn wieder mit Alkohol, sammelte den Niederschlag rasch und trocknete ihn im Vakuum. Der Niederschlag bestand hauptsächlich aus Gummi, imprägniert mit Oenoxydase.

In vieler Beziehung stimmen *Cazeneuves* Ergebnisse mit den bereits angeführten; er findet aber aufserdem noch, dafs das Enzym auf Alkohol und Äther schwach einwirkt, ebenso auf die Stoffe, die dem Wein das Bouquet verleihen. Bezüglich seiner Wirkung auf den Wein fand er, dafs es Entwickelung von Kohlensäure veranlafst und die Menge des Alkohols und der Säure verringert.

Digitized by Google

Die Hauptveränderungen schreibt er der Wirkung des Enzyms auf das Tannin zu. *Martinand* fand, wie bereits erwähnt, dafs mit dessen Entfernung durch Äther der Wein von der Krankheit verschont bleibt. Ob dies auf die gleichzeitige Entfernung der Oenoxydase oder lediglich auf die des Tannins zurückzuführen ist, mufs noch dahingestellt bleiben.

Cazeneuve beweist auch noch in anderer Weise, dafs die Weinkrankheit auf die Wirkung des Enzyms zurückzuführen ist. Er behandelte gesunden Wein längere Zeit mit einem Strom von Sauerstoff, ebenso mit Ozon; in keinem Falle schlug der Wein um.

Das Enzym hält sich beträchtliche Zeit unverändert, wenn es in schwachem Alkohol oder in Wein mit nicht über 9 % Alkohol gelöst ist. Durch starken Alkohol wird es jedoch schnell verändert.

Laborde vermutet, die Oenoxydase sei verschiedenen Ursprungs. Der Pilz Botrytis cinerea wächst gut auf Trauben und sterilem Weinmost. Ein genaues Studium des Pilzes zeigte, dafs es normalerweise das Enzym ausscheidet. Bei seinen Versuchen benutzte er eine Kulturflüssigkeit, in der sich Botrytis reichlich entwickelt hatte, und verglich die Wirkung dieser Flüssigkeit vor und nach dem Kochen. Im ersteren Falle mischte er die Kulturflüssigkeit mit der gleichen Menge gesunden Weines und liefs das Gemisch 4 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur mit der Luft in Berührung. Nach dieser Zeit war die färbende Substanz ausgefallen. Wurde aber die Kulturflüssigkeit vorher gekocht, so trat keine Veränderung ein.

Laborde fand, dafs die oxydierende Kraft des Enzyms, wie es in dem Gemisch von Wein und der Kulturflüssigkeit enthalten ist, beim Erhitzen auf 70° C. zerstört wird. Bei Abwesenheit des Weines widersteht es höheren Temperaturen. Folgende Tabelle veranschaulicht die Wirkung der Temperatur auf das Enzym:

60° C.	zerstört	etwa	die halbe	oxydasische	Kraft
65° „	„	„	zwei Drittel	„	„
70° „	„	„	vier Fünftel	„	„
85° „	„	„	die ganze	„	„ .

Die Oxydase wird durch Sauerstoffaufnahme langsam zerstört; sie verliert nach zwei Tagen ihre halbe Kraft und nahezu

Digitized by Google

die ganze in zwölf Tagen. Die Zerstörung geht im Anfang der Oxydation schneller vor sich als in den letzten Perioden.

Der Pilz enthält im Stadium der vollen Fruktifikation die meiste Oxydase.

Martinand fand, wie bereits erwähnt, Oenoxydase im Safte der Äpfel, Birnen und Pflaumen. Entweder dasselbe Enzym, oder ein ähnliches beschrieb *Lindet*; er schrieb ihm die Eigenschaft zu, den Gerbstoff in den Äpfeln zu oxydieren. Wenn Apfelschnitten oder zerquetschtes Apfelfleisch oder sterile Schwämme, die mit Apfelsaft getränkt sind, unter eine Glasglocke über Quecksilber gelegt werden, so röten sie sich schnell, gleichzeitig wird Sauerstoff absorbiert und Kohlensäure entwickelt. Genau dasselbe beobachtet man, wenn der Apfelsaft vorher durch Porzellan filtriert war, oder wenn antiseptische Stoffe zugesetzt wurden, so dafs es aufser Zweifel steht, dafs die Veränderungen nicht von Mikroorganismen bewirkt werden. Bei Benutzung von gekochtem Saft tritt keine Verfärbung auf, ebenso keine Gasentwickelung.

Wenn der Saft mit Alkohol gefällt, der Niederschlag gesammelt, gewaschen und getrocknet wird, so bewirkt er in dem gekochten Safte die gleichen Veränderungen.

Jedermann weifs, dafs roher Apfelbrei sich anders verhält als gekochter. Letzterer verfärbt sich nicht, während die Oberfläche des nicht gekochten bald rötlich-braun wird, besonders wenn die Äpfel noch unreif waren.

Lindet ist der Ansicht, dafs das Enzym zu dem Tannin in Beziehung steht, und erklärt die Farbenveränderung an verwundeten Früchten durch die Annahme, dafs in dem unverletzten Fruchtfleisch der Gerbstoff und die Enzyme in verschiedenen Zellen sich befinden, aber beim Verletzen des Fruchtfleisches miteinander in Berührung gebracht werden. Diese Annahme erscheint aber überflüssig, denn die Oxydasen wirken, wie wir wissen, auf aromatische Körper nur bei Gegenwart von Sauerstoff ein. Letzterer kann aber nur hinzutreten, wenn das Fruchtfleisch blofsgelegt ist.

Andere Pflanzenoxydasen.

Die verschiedenen Gerüche, die das „Bouquet“ der Weine ausmachen, bringt man gewöhnlich in Verbindung mit Besonder-

Digitized by Google

heiten der durch die verschiedenen Hefen bewirkten Gärungen. Neuerdings hat *Tolomei* Thatsachen mitgeteilt, die es wahrscheinlich machen, dafs einige davon auf bestimmte, aus der Hefe extrahierbare Oxydasen zurückzuführen sind.

Er wies zuerst Oxydasen in der Hefe durch Kultur derselben in starkem Weinmost nach; er benutzte dazu den Saccharomyces ellipsoideus, der vorher in Muskateller-Most gewachsen war. Nach einigen Tagen hatte sich der Organismus reichlich vermehrt; er trennte ihn von dem Most und setzte ihn der Luft aus. Nach einiger Zeit extrahierte er ihn mit Chloroformwasser und fand, dafs die Flüssigkeit eine Oxydase enthielt, die *Bertrands* Laccasereaktionen gab. Ähnliche Ergebnisse erhielt er mit Saccharomyces cerevisiae und Saccharomyces apiculatus. Im ersteren Falle brachte er junge Bierhefe in Dextroselösung und fügte etwas Alkohol hinzu; das Ganze wurde 3 Tage bei 0° C. gehalten und dann zur Befreiung von den Hefezellen durch Porzellan filtriert. Das Filtrat absorbierte Sauerstoff und entwickelte Kohlensäure; in Berührung mit Schwefel entwickelte es Schwefelwasserstoff. Beim Erhitzen auf 72° C. verlor es alle diese Eigenschaften. Auf Zusatz von Alkohol entstand ein Niederschlag, der die Oxydase enthielt. Fügte man etwas von diesem Niederschlag zu der ursprünglichen durch Hitze sterilisierten Flüssigkeit, so erhielt diese ihre durch die Sterilisation verloren gegangenen Eigenschaften wieder.

Tolomei fand weiter, dafs das Bouquet der Muskateller-Weine durch die Oxydase von Saccharomyces ellipsoideus hervorgebracht wurde. Er extrahierte das Enzym aus den Muskatellerhefen und fügte es zu einem gewöhnlichen Weifswein, den er dann der Luft aussetzte. Der Wein erhielt ein Muskateller-Bouquet, das er vorher nicht besafs.

Buchner giebt ebenfalls an, dafs die Bierhefe eine Oxydase enthält, der er die Wirkung zuschreibt, dafs sich der Hefensaft beim längeren Stehen an der Luft bräunt.

Effront beobachtete, dafs die Hefe beträchtliche Mengen Sauerstoff absorbierte, wenn sie in feinen Stückchen der Luft ausgesetzt wurde. Die Sauerstoffaufnahme war von einer beträchtlichen Temperaturerhöhung begleitet. *Effront* vermutet, dafs die Erscheinung der Wirkung einer Oxydase zuzuschreiben ist.

Digitized by Google

Bréaudat fand neuerdings eine Oxydase in den Blättern von *Isatis alpina* und anderen Indigo liefernden Pflanzen. Wie bereits in einem früheren Kapitel erwähnt, bedingt die Indigobildung die Zersetzung eines Glukosids, *Indican*, die durch ein dem Emulsin ähnliches Enzym bewirkt wird. Die Produkte dieser Zersetzung sind Indigoweifs oder *Leukoindigo* und *Indiglucin*, ein Zucker. Das Indigoweifs wird durch eine in den Blättern vorhandene Oxydase in Indigoblau verwandelt. *Bréaudat* giebt an, dafs sie am wirksamsten ist bei Gegenwart eines schwachen Alkalis, z. B. Kalkwasser. Alkali allein ist ohne Wirkung.

Tolomei fand eine Oxydase in reifen Oliven, die das Öl zu oxydieren scheint, wobei Ölsäure, Essigsäure und Sebacinsäure entsteht. *Bouffard* und *Semichon* fanden, dafs rote Trauben eine Oxydase enthalten, die bei Gegenwart von Luft den roten Farbenstoff oxydiert und ausfällt, so dafs aus rotem Traubenmost weifser Wein hergestellt werden kann. *Lepinois* fand einen ähnlichen Körper im ausgeprefsten Saft von Aconit und Belladonna, der die grünfärbende Substanz zerstört. *Boutroux* behauptet, die Farbe des Schwarzbrotes sei auf eine andere Oxydase zurückzuführen, die sich in der Kleie befinde.[1])

Tierische Oxydasen.

Man weifs seit langem, dafs sich in abgelassenem, der Luft ausgesetztem Blut Oxydationsprozesse abspielen. *Claude Bernard* stellte zuerst fest, dafs unter diesen Verhältnissen der Zucker verschwindet; seine Ergebnisse sind von vielen weiteren Forschern bestätigt worden. Aber erst in neueren Jahren wurde gefunden, dafs das Verschwinden des Zuckers auf die Wirkung eines Enzyms zurückzuführen ist; diese Ansicht wird von mehreren Forschern vertreten.

---

[1]) *Grüfs* (Wochenschrift für Brauerei 1899, S. 522 ff.) stellte in der Gerste das Vorhandensein einer Oxydase fest. Bei der Keimung erhöht sich zunächst die oxydasische Wirkung, um später wieder nachzulassen. Aufser diesem Enzym fand *Grüss* (Jahrbuch der Versuchs- u. Lehranstalt für Brauerei in Berlin. Zweiter Band. 1899) im Darrmalz, besonders im Mürbmalz, noch ein anderes Sauerstoffenzym, das er Spermoxydase nannte. Sie verliert leicht bei höherer Temperatur die Eigenschaft, Sauerstoff zu übertragen. Sie befindet sich hauptsächlich im Keimling und zwar auch bei Rohgerste. *Windisch.*


Digitized by Google

Lépine und *Barral* fanden im Jahre 1890 im Verlaufe einer Untersuchung über die Veränderungen des Zuckers im Blute, dafs nach der Entnahme des Blutes eine Glykolyse stattfand, die beim Erwärmen auf 54° zunahm; bei dieser Temperatur hörte sie plötzlich auf. Die physikalische Beschaffenheit der Flüssigkeit war bei dieser Temperatur nicht erkennbar verschieden von der bei 52° C., bei welcher Temperatur deutliche Glykolyse zu beobachten war. *Lépine* und *Barral* fanden ferner, dafs das Blut aus der Pfortader mehr Zucker verlor, als das unter gleichen Bedingungen der Milzader entnommene.

Arthus zeigte etwas später, dafs die Gegenwart lebender Elemente im Blute zu diesem Prozefs nicht nötig ist. Er sammelte Blut unter aseptischen Vorsichtsmafsregeln in sterilisierten Gefäfsen und befreite es von Fibrin. Bei mehrtägigem Stehen bei 10° C. unter antiseptischen Mafsregeln, verlor es fortgesetzt Zucker. Bei anderen Versuchen fand er, dafs im Serum Glykolyse stattfand, ferner im oxalierten, von den Körperchen befreiten Plasma und in dem mit mehreren Raumteilen Wasser verdünnten Blute. Er fand, dafs frisch abgelassenes Blut verhältnismäfsig wenig glykolytische Kraft besafs, dafs diese aber nach einigem Stehen entwickelt wurde.

Diese Versuche sprechen sehr für das Vorhandensein einer Oxydase; bei 0° C. ist die Wirkung am kleinsten, bei 40—50° C. gut und bei 54° am stärksten. Ihre allmähliche Entwickelung ist ebenso bemerkenswert wie die Bildung des pankreatischen Verdauungsenzyms.

Derselbe Gegenstand wurde auch ziemlich ausführlich im Jahre 1892 von *Seegen* geprüft, der fand, dafs das Verschwinden des Zuckers nicht durch die Gegenwart von Chloroform beeinflufst wurde. Diese Substanz verhindert die Wirkung lebender Zellen und der Mikroorganismen, hindert jedoch nicht die Arbeit der Enzyme. *Seegen* fand, dafs der Ausschlufs der Bakterien auf andere Weise die Glykolyse nicht verhindert und schlofs daraus in konsequenter Weise auf das Vorhandensein eines Zucker zerstörenden Enzymes. Bezüglich des Einflusses, den die Temperatur ausübt, bestätigte er die Angaben von *Lépine* und *Barral* und *Arthus*.

Sowohl *Seegen*, als auch *Arthus* vermuteten, dafs das Enzym durch Vorgänge gebildet werde, die sich nach dem Tode im

Digitized by Google

Blute abspielen. *Arthus* hielt die weiſsen Blutkörperchen oder Leukocyten für die Quelle des Enzyms. *Lépine* und *Barral* konnten es aus den Körperchen in gröſserer Menge extrahieren als aus dem Serum.

Weitere Untersuchungen anderer Forscher ergaben, daſs das Zuckerzersetzungsvermögen nicht nur auf das Blut beschränkt ist. *Lépine* fand, daſs die Entfernung des Pankreas des Hundes eine starke Diabetes zur Folge hatte; das Verhältnis von Zucker zum Urin wuchs ganz ungeheuer. Er brachte den Pankreas infolgedessen mit der Ausscheidung einer Oxydase in Verbindung. Fehlt diese, so erscheint der Zucker, der gewöhnlich im Blut zerstört wird, im Harn. Diese Ansicht wurde durch die bereits mitgeteilte Beobachtung gestützt, daſs die Zuckerzerstörung in der Pfortader weit gröſser ist als in der Milzader. *Lépine* fand ferner, daſs der Chylus (Milchsaft), der durch die Eingeweidewände pankreatische Ausscheidungen zugeführt erhält, ebenfalls glykolytische Eigenschaften aufweist. Die Einführung von Chylus in die Drosselader eines Tieres verminderte den Zuckergehalt des lebenden Blutes ganz wesentlich. Eine einprozentige, mit Chylus versetzte Dextroselösung bei 38° gehalten, lieſs eine beträchtliche Zuckerverminderung beobachten.

Lépine und *Barral* fanden später ferner, daſs sowohl beim Blut als auch beim Chylus die glykolytische Kraft durch Temperatursteigerung erhöht und durch Anwesenheit von Kohlensäure gehemmt wird.

Lépine führte weiterhin Untersuchungen über den Hundepankreas aus, die seine Ansicht bestätigten, daſs die Ausscheidung einer glykolytischen Oxydase eine der Funktionen dieses Organes ist. Er zerkleinerte den Pankreas unter aseptischen Vorsichtsmaſsregeln gleich nach der Entfernung aus dem Körper, teigte ihn drei Stunden bei 38° C. mit Wasser ein, das 0,2 % Mineralsäure enthielt, und neutralisierte dann den Auszug mit Natronlauge. Zu 100 ccm der Flüssigkeit fügte er dann ½ g Dextrose und digerierte das Gemisch eine Stunde bei 38° C. Er fand, daſs der Zucker in Mengen von 10—15 % verschwand. Ein frischer Pankreas, mit Wasser statt mit verdünnter Säure extrahiert, lieferte einen Auszug mit sehr geringer glykolytischer Kraft. *Lépine* teilt noch mit, daſs er aus den von ihm benutzten Körper-

Digitized by Google

teil ein glykolytisches Enzym auf dieselbe Weise darstellen konnte, wie man aus derselben Drüse das Trypsin erhalten kann.

Er unterstützte seine Annahme noch durch einen weiteren Versuch; er verglich die glykolytische Kraft des Blutes, das den Pankreas während der Thätigkeit der Drüse verliefs, mit der des die ruhende Drüse verlassenden Blutes. Er fand, dafs das während der durch Reizung des Vagus bewirkten Sekretion dem Pankreas entnommene Blut nur geringe glykolytische Kraft besafs, dafs diese jedoch in dem Blute beträchlich war, dafs aus derselben Ader, aber nach dem Aufhören der Sekretion entnommen war.

Die Arbeiten von *Abelous* und *Biarnés* aus dem Jahre 1894 haben unsere Kenntnisse über dieses Enzym noch erweitert. Diese Forscher untersuchten die Wirkung des Blutes auf Salicylaldehyd. Dieser Körper wurde weder von der Luft, noch von destilliertem Wasser, noch von einer 0,6 prozentigen Kochsalzlösung zu Salicylsäure oxydiert. Wurde jedoch vom Fibrin befreites Blut oder Blutserum dem Aldehyd zugefügt und die Mischung bei 37° C. gehalten, so entstand Salicylsäure. Der Grad der Oxydation wechselte mit dem Blute verschiedener Tiere.

Abelous und *Biarnés* suchten, nach dem Vorbild der Arbeit *Lépines* über den Pankreas, nach dem glykolytischen Enzym in anderen Organen. Sie fanden es auch in den Hoden, in der Schilddrüse, der Leber, der Niere, den Lungen und in der Milz.

Spitzer hat neuerdings die Beobachtungen früherer Forscher bestätigt, jedoch bestritt er anfangs die Ansicht, dafs die Oxydation auf die Wirkung eines Enzyms zurückzuführen sei, indem er sie mit der Oxydation mittelst Wasserstoffsuperoxyd und anderen Oxydationsmitteln verglich.

Im Jahre 1897 veröffentlichte er die Ergebnisse seiner Versuche über das Oxydationsvermögen verschiedener Organe, indem er die Menge des Sauerstoffes mafs, die sie aus Wasserstoffsuperoxyd frei machen konnten. In einigen Fällen mafs er auch das Oxydationsvermögen durch die Menge Salicylsäure, die sie aus Salicylaldehyd bilden konnten. Er fand fast dieselbe Reihenfolge, wie sie *Abelous* und *Biarnés* aufgestellt hatten.

Spitzer machte die sehr wichtige Entdeckung, dafs diese Organe ihre oxydierende Kraft Nukleoalbuminen verdanken, die sie

Digitized by Google

enthalten. Er konnte aus allen Organen, die Glykolyse bewirkten, Nukleoalbumin darstellen, und er fand, dafs die Oxydations-Energie eines Organes der Menge Nukleoalbumin proportional war, die es an ein geeignetes Lösungsmittel abgab. Er fand weiter, dafs diese Albumine sich gegen die Temperaturen ebenso verhielten wie die ursprünglichen Organe und dafs sie durch verschiedene Antiseptika und Gifte in derselben Weise beeinflufst wurden.

Seegen schreibt die glykolytische Kraft des Blutes einer ähnlichen Substanz zu.

Jaquet, ebenso *Salkowski* und *Katsusaburo Yamagiwa* haben diese Ergebnisse bestätigt und behaupten auf Grund ihrer eigenen Versuche, dafs die Wirkung auf ein lösliches Enzym zurückzuführen ist, das beim Kochen und durch längere Berührung mit Alkohol zerstört wird.

Hammarsten fand, dafs die Magenschleimhaut ein anderes zu dieser Gruppe gehöriges Enzym enthält. Es besitzt die Eigenschaft, Laktose (Milchzucker) in Milchsäure zu verwandeln.

Eine andere Oxydase wurde neuerdings von *Piéri* und *Portier* beschrieben; sie kommt in den Kiemen und in dem Blute mehrerer acephalen Mollusken vor, hauptsächlich der Arten Artemis exoleta, Mya arenaria, Tabes pullastra, Ostrea edulis und Pecten jacobaeus. In vielen Punkten ähnelt sie der Laccase, insbesondere in Bezug auf ihr Verhalten gegen Hydrochinon. Die Verfasser geben an, dafs beim Erwärmen, z. B. der Kiemen eines dieser Mollusken auf 50—60° C. in einer Hydrochinonlösung, bald Chinon gebildet wird, das am Geruch kenntlich ist; beim nachherigen Konzentrieren der Flüssigkeit scheiden sich auf der Oberfläche des Gewebes Krystalle von Chinhydron aus.

Die Oxydase kann aus den Kiemen und anderen Organen der Tiere mit Chloroformwasser, oder auch durch Lösungen von Fluornatrium oder Salicylsäure ausgezogen und aus diesen Lösungen durch Alkohol niedergeschlagen werden. Sie wirkt sowohl in neutralem als auch in schwach saurem Medium. Ähnlich der Laccase zersetzt sie Tyrosin nicht.

Digitized by Google

Kapitel XX.

Die alkoholische Gärung.

Die alkoholische Gärung ist die am längsten bekannte und am eingehendsten studierte Gärung. In einem früheren Kapitel haben wir kurz die Entwickelung unserer heutigen Kenntnisse über die alkoholische Gärung dargelegt und gesehen, in welch engem Zusammenhang sie im letzten Jahrhundert mit den verschiedenen Problemen der Biologie der Hefe behandelt wurde.

Die ersten Beobachtungen, die über ihre wahre Natur Aufschlufs geben, machte *Becher* im Jahre 1682; er stellte die fundamentale Thatsache fest, dafs sie nur in zuckerhaltigen Flüssigkeiten möglich ist und dafs der Alkohol aus der Zersetzung eines darin enthaltenen Bestandteiles herrührt.

Mehr als hundert Jahre vergingen, ehe unsere Kenntnisse über die bei dem Gärungsprozefs sich abspielenden chemischen Veränderungen eine wesentliche Erweiterung erfuhren.

Die Untersuchungen von *Lavoisier* bedeuten einen wesentlichen Markstein in der allmählichen Entwickelung unserer Kenntnisse, denn sie wiesen zuerst den Zusammenhang zwischen dem Zucker und den nach der Gärung vorhandenen Produkten nach. *Lavoisier* war der erste, der den Gärungsprozefs quantitativ studierte und bei seinen Untersuchungen neue Methoden in Anwendung brachte. Durch Bestimmung des Kohlenstoffs, Wasserstoffs und Sauerstoffs im Zucker sowohl, als auch in den erhaltenen Gärprodukten, kam er zu dem Schlufs, dafs die Gärung in einer Zerlegung des Zuckers in zwei Teile besteht, von denen der eine auf Kosten des anderen zu Kohlensäure oxydiert, während der andere nach Abgabe eines Teiles seines Sauerstoffs in Alkohol verwandelt wird. Er sagt ferner, dafs wieder Zucker gebildet

Digitized by Google

würde, wenn es möglich wäre, Alkohol und Kohlensäure wieder mit einander zu vereinigen.

Obwohl die von *Lavoisier* benutzten analytischen Methoden unvollkommen und seine Zahlen infolgedessen ungenau waren, so wissen wir doch, dafs seine allgemeinen Schlüsse zutreffend waren. Um das Jahr 1815 stellten Analysen von *Gay-Lussac*, *Thénard* und *de Saussure* definitiv die Zusammensetzung des Zuckers und des Alkohols fest. Diese genaueren Versuche bestätigten *Lavoisiers* Angaben; gleichzeitig aber deckten sie eine Thatsache auf, die lange Zeit unaufgeklärt blieb. Die Berechnung der Zusammensetzung des Rohrzuckers auf Grund der durch die Gärung erhaltenen Gewichtsmengen Alkohol und Kohlensäure deutete auf die Formel $C_6H_{12}O_6$; die Zersetzung des Zuckers wird durch folgende Gleichung versinnbildlicht:

$$C_6H_{12}O_6 = 2\ C_2H_6O + 2\ CO_2$$

Die Analysen, die *Gay-Lussac* und *Thénard* ausführten, führten zur Formel des Rohrzuckers $C_{12}H_{22}O_{11}$. Diese Forscher konnten diese Abweichung nur mit der Annahme erklären, dafs die Analysen des Zuckers nicht ganz genau seien. *Dumas* und *Boullay* stellten die wahrscheinlichere Behauptung auf, dafs die Gärung von einer Wasseraufnahme vor der Spaltung des Zuckers begleitet sei. Auf diese Weise würde die Reaktion nach folgender Gleichung verlaufen:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 4\ C_2H_6O + 4\ CO_2$$

Ganz kurze Zeit nachher entdeckte *Dubranfaut*, dafs der Rohrzucker, ehe er vergoren wird, in einen anderen nicht krystallisierbaren Zucker verwandelt wird, und *Biot* wies nach, dafs er unter der Einwirkung verdünnter Säuren in zwei andere Zucker gespalten wird, die wir jetzt als Dextrose und Lävulose kennen.

Berthelot wies zuerst nach, dafs aufser unorganischen Reagentien auch ein Enzym die Fähigkeit besitzt, den Rohrzucker in dieser Weise zu spalten, und dafs die lebende Hefenzelle dieses Enzym bildet, das bereits in einem früheren Kapitel unter dem Namen Invertase beschrieben wurde.

Es war also nachgewiesen, dafs die Gärung des Rohrzuckers in zwei Phasen vor sich geht; in der ersten wird er durch

Digitized by Google

Wasseraufnahme in zwei Hexosen, Dextrose und Lävulose, gespalten nach der Gleichung:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6;$$

in der zweiten Phase werden diese beiden Zucker unter Bildung von Alkohol und Kohlensäure zersetzt, ganz so, wie es *Gay-Lussac* vermutet hatte.

Bald nach den Veröffentlichungen von *Dumas*, *Dubranfaut* und *Biot* wurde eine weitere Thatsache festgestellt, der man längere Zeit nur geringe Bedeutung beigemessen hat. Im Jahre 1847 fand *Schmidt* in Dorpat, dafs gegorene Flüssigkeiten kleine Mengen Bernsteinsäure enthielten. Es war jedoch erst *Pasteur* vorbehalten, diese Entdeckung zu vervollständigen. Aus seinen sorgfältigen Untersuchungen ergab sich, dafs etwa 4—5 % des bei einer Gärung verschwindenden Zuckers nicht der gewöhnlichen Zersetzung unterliegen, sondern in Glycerin, Bernsteinsäure und Kohlensäure zerfallen.

Pasteur stellte folgende Gleichung für den Verlauf dieser Zersetzung auf:

$$98\,C_6H_{12}O_6 + 60\,H_2O = \underset{\text{Bernsteinsäure}}{24\,C_4H_6O_4} + \underset{\text{Glycerin}}{144\,C_3H_8O_3} + 60\,CO_2$$

Nach *Monoyer* verläuft die Reaktion nach folgender Gleichung:

$$8\,C_6H_{12}O_6 + 6\,H_2O = 2\,C_4H_6O_4 + 12\,C_3H_8O_3 + 4\,CO_2 + O_2$$

Nach dieser Annahme wäre der Zuckerzerfall mit dem Freiwerden einer kleinen Menge Sauerstoff verbunden, eine Thatsache, deren Bedeutung wir später sehen werden.

Béchamp und später *Duclaux* fanden, dafs während der alkoholischen Gärung auch kleine Mengen Essigsäure gebildet werden. *Duclaux* behauptet, dafs diese ganz regelmäfsig vorhanden sei, dafs ihre Menge jedoch nur 0,5 % des Zuckers übersteige, wenn die Gärung sofort nach Zersetzung des Zuckers unterbrochen werde. *Béchamp* giebt an, dafs unter geeigneten Bedingungen die Menge der Essigsäure bedeutend gröfser sein kann.

Andere Forscher fanden wechselnde, aber stets kleine Mengen Aldehyd als Begleiter der Gärung.

Der gewöhnliche Alkohol ist oft mit höheren Alkoholen gemischt; Propyl-, Isobutyl-, Amyl-, Oenanthyl- und Capryl-Alkohol sind nachgewiesen worden; der Amylalkohol kommt oft in gröfseren Mengen vor.

Digitized by Google

Die Mengen dieser Nebenprodukte scheinen unter verschiedenen Gärbedingungen sehr weitgehend zu wechseln. Verläuft die Gärung langsam, so wird mehr Bernsteinsäure gebildet, als wenn die Gärung schnell verläuft. Die verschiedenen Hefenarten zeigen unter einander in Bezug auf diese verschiedenen Produkte beträchtliche Unterschiede. In der That scheinen letztere viel enger mit der biologischen Arbeit der Hefenzellen verknüpft zu sein als der Aethylalkohol, dessen Bildung dem Prozefs das charakteristische Gepräge giebt. Die Beziehung des Alkohols zum gewöhnlichen Stoffwechsel ist noch nicht aufgeklärt.

Wir haben gesehen, dafs man lange Zeit nur den Rohrzucker mit der alkoholischen Gärung in Beziehung brachte. In neuerer Zeit ist über die Zusammensetzung der verschiedenen Zucker viel Licht verbreitet worden, hauptsächlich durch die Untersuchungen von *Emil Fischer*. Ohne uns ins Einzelne zu verlieren, was den Rahmen des vorliegenden Buches weit überschreiten würde, können wir die gewöhnlich vorkommenden Zucker in zwei Hauptgruppen einteilen, deren einfachste die Formel $C_n H_{2n} O_n$ besitzt; der Wert von n liegt für die bekannten Zucker zwischen 2 und 9. Die Glieder der anderen Gruppe sind komplexer; sie bestehen theoretisch aus zwei oder drei Molekülen einer Hexose unter Austritt von einem oder zwei Molekülen Wasser. So haben wir den Rohrzucker $C_{12} H_{22} O_{11}$ entsprechend $2 (C_6 H_{12} O_6) - H_2 O$; oder Raffinose $C_{18} H_{32} O_{16}$, entsprechend $3 (C_6 H_{12} O_6) - 2 H_2 O$. Diese Gruppe wird allgemein als die der Polysaccharide bezeichnet.

Die vergärbaren Zucker scheinen alle der ersten Gruppe anzugehören und zwar insbesondere der Gruppe der Hexosen $C_6 H_{12} O_6$. Einige der anderen sind jedoch auch gärfähig, doch nur die, bei denen der Wert für n durch 3 teilbar ist.

Einige der Polysaccharide scheinen auf den ersten Blick vergärbar zu sein, besonders Rohrzucker und Maltose. *Fischer* jedoch fand, dafs sie durch das Alkohol bildende Element nicht direkt angegriffen, sondern zuerst unter Bildung von Hexosen hydrolisiert werden. Wir sahen, dafs für den Rohrzucker diese Thatsache zuerst festgestellt wurde von *Dubrunfaut* und später von *Berthelot*. Dieser Zucker liefert unter der Einwirkung von Invertase Dextrose und Lävulose. In ähnlicher

Digitized by Google

Weise wird jedes Maltosemolekül durch Hydrolyse in zwei Moleküle Dextrose zerlegt. Laktose oder Milchzucker wird in Dextrose und Galaktose gespalten. Die anderen Polysaccharide verhalten sich ähnlich.

Die verschiedenen Hexosen zerfallen auch mehr oder weniger leicht in Alkohol und Kohlensäure. Dextrose wird sehr leicht angegriffen, Lävulose weniger leicht, und Galaktose gärt nur sehr schwer.

Der Verlauf der Gärung hängt auch in hohem Maſse von der benutzten Hefenrasse ab. In dieser Beziehung hat unsere Erkenntnis in den letzten zwanzig Jahren wesentliche Fortschritte gemacht, die wir hauptsächlich den Forschungen *Hansens* verdanken.

Es ist schwierig, die Wichtigkeit seiner Untersuchungen über die Biologie der Hefe zu übersehen. Man kann wohl sagen, daſs seit *Pasteur* kein zweiter zur Klärung der Frage der alkoholischen Gärung mehr beigetragen hat. *Hansen* war einer der ersten, der genauere Methoden zur Züchtung von Mikroorganismen im Zustande der Reinheit angegeben hat. Durch seine Methoden konnte er den Nachweis führen, daſs die Saccharomyceten in Wirklichkeit eine gesonderte und bestimmte Gruppe Alkohol bildender Pilze darstellen; auch förderte er neue Gesichtspunkte bezüglich der Arten und Rassen zu Tage. Es liegt nicht in dem Zwecke dieses Buches, *Hansens* Arbeiten im einzelnen zu besprechen, da sie mehr die biologischen Eigentümlichkeiten der Hefenpflanze betreffen als die weitere Frage nach den chemischen und physikalischen Veränderungen, die sie bewerkstelligt. Erwähnt sein mögen jedoch seine Untersuchungen über die Bedingungen der Sporen- und Hautbildung, ebenso über die Morphologie dieser Entwickelungsphasen und deren Lebensgang, wobei er insbesondere als Repräsentant dieser Gruppe die unter dem Namen Saccharomyces apiculatus bekannte Art heranzog. Seine Untersuchungen über die durch wechselnde Lebensbedingungen veranlaſsten Veränderungen, z. B. durch den Einfluſs der Winterkälte, sowie über die Variationen, die auf solche primären Veränderungen folgen, haben in dieser Beziehung viel Licht verbreitet.

Hansens Untersuchungen waren von groſsem Einfluſs auf die industriellen Methoden der Bier- und Weinfabrikation. Man

Digitized by Google

kann wohl sagen, dafs er und seine Schüler in dieser Beziehung revolutionär gewirkt haben.

Hansen hat jedoch auf diesem Gebiete nicht allein gearbeitet. Andere Forscher beschrieben andere Arten, zumal nachdem gefunden wurde, dafs andere Pilze aufser den Hefen, besonders Mucorarten, ebenfalls imstande waren, alkoholische Gärung zu bewirken. Hierüber hat sich ebenfalls eine reiche Litteratur aufgethan, die jedoch hier nicht im einzelnen erörtert werden kann. —

Der Gärverlauf in Gemischen gärfähiger Zucker ist bei Anwendung verschiedener Hefen oft verschieden. Die meisten Hefen enthalten hydrolytische Enzyme, die die Hydrolyse der Polysaccharide Rohrzucker und Maltose bewirken können. Fehlt jedoch eines der invertierenden Enzyme, so kann die Hefe die betreffenden Zucker nicht vergären. Die Hefen z. B., die keine Invertase enthalten, sind ohne Einwirkung auf Rohrzucker. *Hansens* sechs wahre Saccharomycesarten hydrolysieren alle sowohl Rohrzucker, als auch Maltose, und vergären deren Spaltungsprodukte. Sacch. Marxianus unterscheidet sich von diesen dadurch, dafs er Maltose nicht angreift, während Saccharomyces membranaefaciens keinen der beiden Zucker angreift. Andere Organismen haben ähnliche Eigenheiten.

Da also die Vergärung der Zucker durch Hefe eine Funktion der lebenden Zelle ist, so ist alles, was das Leben der letzteren beeinflufst, ebenfalls von Einflufs auf ihr Gärvermögen. Die Körper, die als Hefennahrung dienen, fördern die Gärung; Säuren und Basen schädigen die Zelle und zwar ist ihre Wirkung um so ausgesprochener, je konzentrierter sie sind. Die Mengen Säure, die in dieser Beziehung in Betracht kommen, sind von verschiedenen Forschern verschieden angegeben worden. *Hayduck* fand, dafs 0,1 % Schwefelsäure die Gärungsenergie schädigt, während 0,7 % sie ganz aufhob. Salzsäure erwies sich als weniger schädlich, doch wurde die Gärung ungünstig beeinflufst durch 0,2 %. Die Entwickelung der Hefenpflanze wurde durch 0,02 % Schwefelsäure begünstigt oder auch durch 0,1 bis 0,5 % Milchsäure, doch geschädigt durch 0,07 % Schwefelsäure oder 1,5 % Milchsäure. Bei Gegenwart von 0,2 % Schwefelsäure oder 4 % Milchsäure vermehrten sich die Hefezellen nicht. *Bokorny* fand, dafs Schwefelsäure von ungünstigem Einflufs sei, und dafs

Digitized by Google

die Gärung bereits durch diese Säure in einer Menge von 1 : 20000 gehindert wurde, während die vierfache Menge sie gänzlich zum Stillstand brachte. Der Verfasser fand, dafs die Entwickelung der Hefenpflanze durch 0,5 % Milchsäure ausgesprochen gehemmt wird.

Unter den schädlichen Substanzen führt *Bokorny* noch auf: Sublimat, übermangansaures Kali, freies Chlor und Jod. Phosphor hemmt auch die Gärung. *Bokorny* stellte eine Lösung her, die neben Rohrzucker und Mineralsalzen Phosphor im Verhältnis von 1 : 20000 enthielt. Nach Zuführung von Hefe trat nach 6 Stunden eine schwache Gärung ein.

Brom ist weniger schädlich als Chlor und Jod. In einer Menge von 1 : 10000 wird die Gärung noch nicht gehemmt; einprozentige Lösungen von chlorsaurem Kali oder Jodkalium sind auch ohne schädlichen Einflufs. Sehr dünne Lösungen von Cyankalium oder salpetersaurem Strichnin (1 : 50000) hindern die Gärung nicht völlig, ebensowenig essigsaures Chinin in 0,1prozentiger Lösung.

Auch andere Kohlenhydrate sind nach den Untersuchungen weiterer Forscher der alkoholischen Gärung fähig. *Levy* erhielt bei der Vergärung von Artischockenknollen mit Hefe Alkohol; *Buchner* zeigte, dafs das Glykogen der Hefe Alkohol liefern kann.

Pasteur fand, dafs bei der Einwirkung einer sehr grofsen Menge Hefe auf sehr kleine Mengen Zucker die Gärung noch nach der Zerstörung des Zuckers eine Weile fortdauert. Diese letzten Stadien des Prozesses wurden infolgedessen durch die Vergärung anderer, in der Hefe enthaltener Kohlenhydrate bewirkt. Er wies dies nach, indem er die Flüssigkeit während des Verlaufes der Gärung auf Zucker prüfte. Es wurde ungefähr dreimal so viel Kohlensäure entwickelt als dem angewandten Zucker entsprach. Der gebildete Alkohol entsprach der Menge nach der gebildeten Menge Kohlensäure.

Pasteur zeigte ferner, dafs beim Mischen frischer Hefe mit Wasser und Stehenlassen des Gemisches bei 25° C. sich sehr bald Kohlensäure entwickelt und bei Destillation der Flüssigkeit nach nicht sehr langer Versuchsdauer Alkohol erhalten wird. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist dieser Vorgang nichts

Digitized by Google

anderes als eine Gärung anderer, in der angewandten Hefe enthaltener Kohlenhydrate.

Diese Vorgänge erweisen sich aber bei näherer Prüfung als ganz ähnlich denen, die sich bei der Vergärung der Polysaccharide abspielen. Das Material ist nicht direkt vergärbar, sondern es werden zunächst daraus Zucker vom Hexose-Typus gebildet. Das Kohlenhydrat, das in der Artischockenknolle in grofser Menge enthalten ist, ist Inulin; wir sahen aufserdem, dafs das Inulase-Enzym in den Zellen ebenfalls enthalten ist. Das Inulin wird von der Inulase in Lävulose verwandelt, die durch die Hefe leicht vergoren wird. In der Praxis werden die gewaschenen und geschnittenen Knollen mit der vierfachen Menge einer wässerigen 0,2prozentigen Weinsteinlösung behandelt. Man läfst dies Gemisch 4—5 Stunden bei etwa 16° C. stehen, giefst dann ab und wiederholt denselben Prozefs mit einer neuen Weinsteinlösung. Der erhaltene Auszug, der die aus der Hydrolyse des Inulins gebildete Lävulose enthält, hatte ein spezifisches Gewicht 1,030. Durch Erhitzen an drei verschiedenen Tagen zum Kochen wird er sterilisiert und dann mit Hefe versetzt, wonach rasch Gärung eintritt. Der Gärprozefs wird bei einer Temperatur von 20—25° C. durchgeführt und dauert 8 Tage; der Alkohol wird dann abdestilliert. Das Inulin wird bei der ersten Extraktion mit verdünnter Weinsteinlösung in Lävulose verwandelt. Auch bei den *Pasteur*schen Versuchen unterliegt es keinem Zweifel, dafs der Gärung eine Hydrolyse voraufging.

Der Gärung des Milchzuckers oder der Laktose liegt die Herstellung der unter dem Namen *Kumifs* und *Kephir* bekannten Getränke zu Grunde, die in Rufsland und Centralasien in grofsem Mafsstab bereitet werden. Laktose ist ein Polysaccharid von der empirischen Formel des Rohrzuckers und wird wie dieser durch ein der Invertase ähnliches Enzym zersetzt. Die Produkte der Hydrolyse sind Dextrose und Galaktose; beide sind vergärbar, wenn letztere auch nur schwer.

Kumifs wird hauptsächlich in den Steppen des südwestlichen Sibiriens und den anstofsenden Ländern hergestellt. Es wird hierzu zumeist Stutenmilch benutzt; die Fabrikation des Kumifs ist in den verschiedenen Gegenden eine verschiedene. Es wirken dabei offenbar mehrere Organismen mit, darunter Hefe und

Digitized by Google

andererseits Milchsäure bildende Bakterien. Die Organismen werden zum Zwecke der Gärung nicht getrennt, sondern es wird etwas alter Kumifs mit frischer Milch vermischt, gewöhnlich im Verhältnis von 1 : 10. Die Gärung wird in kleinen Fässern durchgeführt, die mit einem Rührwerk versehen sind. Zu Beginn des Prozesses ist es zweckmäfsig, behufs gründlicher Durchlüftung das Rührwerk 5 Minuten gehen zu lassen. Am Ende der Gärung kommt die Flüssigkeit auf starke Flaschen, die gut verkorkt werden; die Korke werden noch verschnürt. Durch die Weitergärung auf der Flasche wird der Kumifs zu einem kohlensäurereichen schäumenden Getränk. Was die bei der Gärung sich abspielenden Veränderungen anlangt, so entsteht aus dem Milchzucker Alkohol, Kohlensäure und Milchsäure. Die Milch enthält ungefähr 5,5 % Milchzucker. Der Kumifs enthält etwa 1,3 % Zucker, 1,6 % Alkohol und fast 1 % Milchsäure und Kohlensäure.

Die Eiweifsstoffe der Milch scheinen sich etwas zu verringern, etwa um 0,1 %; doch kennt man die Natur der Veränderungen nicht. Wahrscheinlich wird das Kaseïn in Acid-Albumin und Pepton verwandelt, da es unter der Einwirkung der Milchsäure nicht gerinnt, wie es gewöhnliche Milch thut. Wahrscheinlich bewirkt ein proteolytisches Enzym diese Veränderungen, wie es, wie wir sahen, sowohl von den Hefen als auch den Bakterien ausgeschieden wird.

Kephir ist ebenfalls ein kohlensäurereiches, schäumendes Getränk, das aus Kuhmilch bereitet und in den Bergen des Kaukasus viel getrunken wird. Die Natur der bei seiner Bereitung in Frage kommenden Organismen kennt man noch nicht; sie scheinen aber aus Hefe zu bestehen, die mit einem oder mehreren Bakterien vergesellschaftet sind. Der Gärungserreger bildet gelatinöse Klumpen, die in der Hauptsache aus einer Art Cellulose bestehen, die wahrscheinlich die Hüllen oder Zooglöeen der Bakterien bildeten, und die die Hefen mechanisch einschliefst. Die Bereitungsweise des Kephirs ist genau dieselbe wie die des Kumifs'. Die Milch wird bei 18—19 ° C. auf dem Gärgefäfs mit dem Organismus versetzt und die Flüssigkeit in Bewegung gehalten. Nach 24 Stunden ist die Gärung bereits sehr weit vorgeschritten; die Flüssigkeit wird dann auf Flaschen gezogen, wo die Gärung sich vollendet.

Digitized by Google

Die Produkte der Kephirgärung unterscheiden sich etwas von denen der Kumifsgärung. Der Zuckergehalt der Milch fällt von 4 auf 2 %; der Fettgehalt wird etwa in derselben Menge verringert, und die Eiweifsstoffe werden auf etwa $^3/_4$ der ursprünglichen Menge vermindert. Der Alkohol erreicht zumeist den Betrag von 1 %, Milchsäure entsteht in etwas gröfserer Menge, das Verhältnis zwischen Alkohol und Milchsäure ist 8 : 9. Kumifs enthält, wie wir sahen, bedeutend weniger Milchsäure als Alkohol. Die Eiweifsstoffe scheinen von dem Kephirorganismus nicht peptonisiert zu werden, obwohl das Kaseïn verändert zu werden scheint, denn es wird durch die Milchsäure nicht mehr vollkommen gefällt.

Bei beiden Prozessen laufen offenbar zwei verschiedene Gärungen nebeneinander her; die eine wird durch die Hefe veranlafst und erzeugt Alkohol; die andere ist auf Bakterien zurückzuführen und ist von Milchsäurebildung begleitet.

Als drittes Beispiel für eine mit anderen chemischen Umwandlungen verknüpfte alkoholische Gärung haben wir in dem in manchen ländlichen Distrikten Englands zur Erzeugung eines schäumenden Getränkes benutzten Organismus, nämlich dem des Ingwerbieres. In vieler Hinsicht ähnelt dieses dem Kephir des Kaukasus. Obwohl es bereits seit sehr vielen Jahren getrunken wird, so interessierte man sich doch erst im Jahre 1887 für seine Zusammensetzung. Eine genaue Untersuchung über die Natur des Ingwerbier-Organismus hat *Marshall Ward* im Jahre 1891 durchgeführt.

Der Ingwerbier-Organismus ähnelt dem Kephir-Organismus in seinem Aussehen; er besteht aus weifsen, halbdurchscheinenden Massen von unregelmäfsiger Form und fast gelatinöser Beschaffenheit. In der Gröfse schwanken sie zwischen der eines Stecknadelkopfes und der von Gebilden mit einem Dezimeter Durchmesser. In einer gärenden Flüssigkeit wachsen sie sehr flott und werden dabei weicher und schleimiger als sie es im trocknen Zustande sind.

Marshall Ward beschreibt die Gärung folgendermafsen:

„Die charakteristischsten Eigentümlichkeiten weisen die oben beschriebenen Knollen des Ingwerbier-Organismus auf, wenn sie in Zuckerlösungen verbracht werden, am besten in folgender Weise:

Digitized by Google

Eine Sodawasserflasche wird zu drei Viertel mit *Pasteur*scher Flüssigkeit oder einer ähnlichen Zuckerlösung gefüllt; dazu giebt man etwas Ingwer und einige Körner des Ingwerbier-Organismus'. Die Flasche wird dann gut verkorkt, an einen warmen Ort gestellt und von Zeit zu Zeit beobachtet. In 24—48 Stunden, je nach der Jahreszeit, Temperatur u. s. w. wird die Flüssigkeit immer trüber, Gasblasen beginnen hochzusteigen, die Gärung geht schnell vor sich, und wenn der Kork nicht durch Bindfäden oder anderweitig gut befestigt ist, wird er herausgetrieben. Diese Trübung wird fast ausschliefslich von zahllosen Hefezellen verursacht, die von dem Ingwerbierferment ausgehen, das in der Flüssigkeit schwimmend auf- und niedersteigt, die sich in der Flüssigkeit dann vermehren und bald einen grauen Bodensatz bilden. Das Auf- und Absteigen der Fermentkörner wird durch die sich an ihrer Oberfläche reichlich entwickelnden Gasblasen bewirkt. Die Flüssigkeit ist nicht nur mit Kohlensäure übersättigt, sondern ist auch mehr oder weniger zäh; diese Zähigkeit rührt weder vom Zucker noch von einem anderen zugesetzten Material her. Die Zähigkeit nimmt mit der Zeit zu; manchmal wird die Flüssigkeit so dick, dafs die Gasblasen nur noch langsam hochsteigen. Die Zähigkeit ist auch nicht nur auf das blofse Vorhandensein von Hefezellen zurückzuführen, da diese zu Boden gehen; sie rührt vielmehr her von der Gegenwart zahlloser, geschwollener oder schleimiger wurmförmiger Körperchen, die durch die ganze Flüssigkeit hindurch verteilt sind. Auch kann man Myriaden von stäbchenförmigen Bakterien beobachten. Das Ingwerbier ist auch deutlich sauer; die Farbe der Flüssigkeit ist blasser als die der ursprünglichen Lösung."

Durch eine sehr eingehende und mühsame Untersuchung stellte man fest, dafs die Fermentkörner aus mehreren Organismen bestehen, von denen zwei die Hauptmasse ausmachen, während die übrigen mehr als Verunreinigungen anzusehen sind. Die beiden in Frage kommenden Organismen sind eine Hefe, Saccharomyces pyriformis und ein Spaltpilz, den man Bacterium vermiforme genannt hat. *Marshall Ward* konnte in der That das „Ingwerbier-Ferment" aus Reinkulturen dieser getrennten Organismen, die er aus einer gärenden Flüssigkeit isoliert hatte, darstellen.

Digitized by Google

Das Bakterium ist ein eigenartiger wurmförmiger Organismus, der aus faden- oder stäbchenförmigen, oft homogenen, vielfach aufgerollten, zusammengeflochtenen Körpern besteht, die oft zu kurzen Stäben oder gar Kokken auseinanderfallen, wobei die Zellen sich zu Ketten anordnen. Die getrennten Fäden sind mit einer häutigen, geschwollenen gelatinösen Hülle bekleidet, die dem ganzen Organismus seine besondere Konsistenz verleiht. In der Mitte dieser gelatinösen, aufgerollten Fäden scheinen die Hefenzellen mechanisch eingeschlossen zu sein. Das Ganze ist eine symbiotische Pflanze, die dem Thallus einer Flechte gleicht, in der die Hefe die Alge vertritt.

Die „Ingwerbierpflanze" verursacht Gärung in Lösungen von Trauben- und Rohrzucker, in letzterem jedoch leichter. Von den Kephirkörnern unterscheidet sie sich dadurch, dafs sie Milchzucker nicht zu vergären vermag.

Aufser der entwickelten Kohlensäure enthält die Flüssigkeit am Schlusse der Gärung Alkohol und Essigsäure neben verhältnismäfsig grofsen Mengen einer anderen Säure, die noch nicht näher geprüft ist, die jedoch der Milchsäure zu gleichen scheint. Alkohol und Essigsäure werden während des ersten Stadiums der Gärung gebildet, die andere Säure tritt erst später auf.

Ein anderer Organismus ähnlicher Natur wurde jüngst vom Verfasser in Gemeinschaft mit *Marshall Ward* beschrieben. Er kommt als Parasit auf dem Zuckerrohr vor und wurde ursprünglich aus Madagaskar bezogen. Er besteht aus gelatinösen Massen, ähnlich dem Ingwerbierferment, und besteht wie dieses aus einer Hefe und einem Bakterium, welch letzteres dem beschriebenen Ingwerbierbakterium sehr ähnlich ist. Der Organismus vergärt Rohrzucker, Maltose, Dextrose und Lävulose, aber nicht Laktose. Die Produkte der Gärung sind Alkohol, Kohlensäure und gewisse andere Säuren, hauptsächlich Essigsäure und Bernsteinsäure. Bei der Kultur in Rohrzuckerlösung bilden sich zähe Stoffe, die hauptsächlich, wie es scheint, aus den äufserst dünnflüssig gewordenen Hüllen des Bakteriums bestehen. Diese Substanz kann in grofsen Mengen aus Reinkulturen des letzteren erhalten werden; es besteht aus zwei Modifikationen der Cellulose, die den Dextranen oder Hemicellulosen verschiedener Autoren ähneln. Die Hefe erzeugt neben Alkohol und Kohlensäure noch kleine Mengen Bernsteinsäure.

Digitized by Google

Das Bakterium bildet Essigsäure, jedoch direkt aus dem Zucker und nicht aus Alkohol, den es, ganz unähnlich dem gewöhnlichen Essigbakterium, nicht zu zersetzen vermag. Das Bakterium gehört auch zu den wenigen Bakterien, die Invertase ausscheiden.

Aufser den Hefen und derartigen symbiotischen Organismen giebt es noch andere Pilze, die Gärung zu erregen vermögen. Die Chinesen stellen ein geistiges Getränk her, zu dessen Bereitung eine mit dem Namen Koji belegte Masse verwendet wird. Dieses Koji wird bereitet durch Impfen frisch gedämpften Reises mit den Sporen von Eurotium (Aspergillus) oryzae. Das gebleichte, hülsige Korn wird 12 Stunden gedämpft, bis es weich ist; dann wird es auf Strohmatten abgekühlt. Ist die Temperatur auf 28—35° C. gefallen, so wird eine kleine Menge von der Masse mit den Sporen des Pilzes vermischt und dann in die übrige Masse eingerührt. Dann läfst man die Matten mit ihrem Reisbelag 18—24 Stunden in einem Keller stehen; nach dieser Zeit hat sich aus den Sporen ein beträchtliches Mycel gebildet. Das Material wird dann mit der Hand zusammengeknetet und in Kübeln im wärmsten Teil des Kellers stehen gelassen. Nach 12 Stunden wird dieser Prozefs wiederholt, wobei die Masse abgekühlt und mit etwas Wasser angefeuchtet wird. Dann wird die Masse noch einmal durchgearbeitet, und nach weiteren 14 bis 16 Stunden ist der Koji gebrauchsfertig. Der wirksame Bestandteil der Masse rührt vom Pilz her, der, wie wir bereits sahen, diastatische, invertierende und andere Enzyme enthält. Er vermag auch Alkohol aus dem Zucker zu bilden, der mittelst der Enzyme aus den stärkehaltigen Materialien gebildet wird, mit denen der Pilz vermischt wurde. Milchzucker greift er nicht an.

Einen anderen Pilz mit ähnlichen Eigenschaften beschrieb *Wehmer*; er nannte ihn Aspergillus Wentii. Er ähnelt sehr dem Aspergillus oryzae, er kann jedoch nur erhalten werden durch Bedecken gekochter und oberflächlich wieder getrockneter Bohnen mit den Blättern von Hibiscus tileacus. Der Pilz kommt nur auf den Blättern vor. Er ist durch seine schwache Schokoladenfarbe ausgezeichnet. Die Methoden zur Sammlung des Pilzes gleichen genau denen, deren sich die Chinesen bei der Fabrikation des Arraks bedienen.

Arrak wird in Java aus Reisstärke gewonnen unter Benutzung

Digitized by Google

einer Substanz, die die Eingeborenen „Raggi“ nennen. Es ist dies ein an Mikroben und Pilzen reiches Material; welches aber der Alkohol bildende Organismus ist, weifs man noch nicht. „Raggi“ ist neuerdings durch *Went* und *Prinsen-Geerlichs* untersucht worden, die mehrere der Raggiorganismen rein züchteten. Einen derselben nannten sie Chlamydomucor oryzae; es ist dies ein Pilz, der ein vielfach verzweigtes, ungeteiltes Mycel bildet. Er ist aërob, scheidet Lab und Diastase aus, invertiert jedoch weder Rohrzucker, noch vergärt er Dextrose. Einen anderen isolierten Pilz nannten sie Monilia javanica. Dieser vermag Dextrose, Lävulose, Raffinose, Maltose und Rohrzucker zu vergären, welch letzteren er invertiert. Ein wahrer Saccharomyces, den die Verfasser Saccharomyces vordemannii nennen, scheint der hauptsächlichste Alkoholbildner bei der Herstellung des Arraks zu sein.

Wird Mucor racemosus, statt ein gewöhnliches Mycel zu bilden, in Zuckerlösung kultiviert, so bildet er runde oder eiförmige Zellen, die der Bierhefe sehr ähneln und sich auch durch Sprossung rasch vermehren. Andere Mucorarten verhalten sich ähnlich. Diese Pilze können wohl Dextrose, wahrscheinlich aber nicht Lävulose vergären. Bei der Kultur in Invertzucker vergären sie nur die Hälfte des Zuckers. Im allgemeinen ist die Gärung, die sie hervorrufen, viel schwächer als die der wirklichen Hefen und wird auch viel eher durch den gebildeten Alkohol zum Stillstand gebracht. Mucor erectus kann 8 % Alkohol in einer Zuckerlösung bilden, Mucor racemosus nur 3 %, Mucor stolonifer nur 1,3 %.

Mucor racemosus bildet nicht Alkohol und Kohlensäure in demselben Verhältnis wie die Hefe, d. h. wie 100 : 96,3, sondern, wie *Fitz* feststellte, im Verhältnis von 123,1 : 100. Der Alkohol enthält etwas Aldehyd; Bernsteinsäure bildet sich ebenfalls als Nebenprodukt. Ob Glycerin gebildet wird, ist noch nicht sicher festgestellt.

Die verschiedenen Mucorarten können nicht alle Rohrzucker vergären, da einige von ihnen keine Invertase bilden und infolgedessen den Rohrzucker nicht hydrolysieren können.

Penicillium glaucum und Rhizopus nigricans sollen auch alkoholische Gärung erregen können.

Perdrix beschrieb im Jahre 1891 einen merkwürdigen Bacillus,

Digitized by Google

den er aus dem Wasser der Seine isolierte. Unter anderem vermag er bei der Kultur in stärkehaltigen Medien Alkohol zu bilden. Die Stärke wird erst in Zucker verwandelt, dieser wird teilweise vergoren. Eine Lösung von 4,5 g Stärke in 200 ccm Wasser vergor mit dem Bacillus bei Luftabschlufs; die Flüssigkeit hatte nach der Gärung folgende Zusammensetzung:

Zucker . . .	3,52 g	Essigsäure . .	0,08 g
Äthylalkohol .	0,347 „	Buttersäure . .	0,175 „
Amylalkohol .	0,082 „		

Während der Gärung entwickelte die Flüssigkeit 0,407 g Kohlensäure und 0,022 g Wasserstoff.

Perdrix gab dem Bacillus den Namen Bacillus amylozyme.

Er vergärt Weizen-, Mais-, Roggen- und Gerstenstärke. Auf Zusatz von Hefe zu einer Kulturflüssigkeit, die diesen Bacillus enthält, arbeiten beide Organismen symbiotisch; unter diesen Verhältnissen werden 90 % der theoretischen Alkoholmenge gebildet.

Fitz hat gefunden, dafs auch aus Glycerin, ebenso wie aus Zucker, Alkohol gebildet werden kann; der Organismus, der diese Umwandlung bewirkt, ist ein Mikrobe, den er Bacillus aethylicus genannt hat, und der aus einem Heuaufgufs gewonnen werden kann. Er züchtete ihn in 0,1 prozentiger Liebig's Fleischextraktlösung, der er 3 % Glycerin zugefügt hatte. 200 g Glycerin lieferten 25,8 g Alkohol.

Der Organismus von *Fitz* ist auch von *Emmerling* kultiviert worden; dieser Forscher fand, dafs er aufser aus Glycerin auch noch aus Mannit Alkohol zu bilden vermag. *Emmerling* fand ferner, dafs Granulobacter butylicus Butylalkohol aus Dextrose zu bilden vermag.

Alkohol tritt auch als Nebenprodukt bei mehreren anderen Gärungen auf, die in einem späteren Kapitel betrachtet werden sollen.

Die Bildung von Alkohol durch die Pflanzenzelle ist jedoch nicht auf die bislang betrachteten niederen Organismen beschränkt. Viele Thatsachen berechtigen zu dem Schlusse, dafs dies eine Eigenschaft des lebenden Plasmas ist, die sich jedoch nur äufsert, wenn das Plasma unnormalen Bedingungen ausgesetzt wird, z. B., wenn man ihm den Sauerstoff entzieht. Die ersten Beobachtungen

Digitized by Google

in dieser Beziehung machte *Bérard* im Jahre 1821. Sie sind jedoch sehr dürftig und unvollständig; wir erfahren aber doch, dafs beim Aufbewahren gewisser Früchte in einem geschlossenen, Kohlensäure oder ein anderes indifferentes Gas enthaltenden Gefäfs sich ständig Kohlensäure entwickelt, was er einer Art Gärung zuschrieb.

Lechartier und *Bellamy* waren die ersten, die diesen Vorgang aufklärten. Ihre Beobachtungen, die sie in den Jahren 1869 und 1872 veröffentlichten, haben viel Licht auf die alkoholische Gärung im allgemeinen geworfen. Sie untersuchten hauptsächlich saftige Früchte, z. B. Äpfel, Birnen, Kirschen und Stachelbeeren; auch Kartoffeln und Weizenkörner. Wurden diese in geschlossene Gefäfse verbracht, von denen Rohre in Quecksilber mündeten, so wurde allmählich aller freier Sauerstoff absorbiert unter gleichzeitiger Kohlensäureentwickelung. Die Entwickelung dieses Gases dauerte noch fort, nachdem aller Sauerstoff aufgebraucht war, wurde jedoch im Laufe der Zeit schwächer. Während des Versuches kamen die Früchte miteinander nicht in Berührung, auch nicht mit den Wänden der Gefäfse, in denen sie sich befanden. Nach einigen Monaten wurden die Früchte herausgenommen, zu Brei zerquetscht und die Masse destilliert, wobei eine beträchtliche Menge Alkohol überging. Die sehr sorgfältige mikroskopische Untersuchung ergab die Abwesenheit jeglicher Mikroorganismen.

Einer ihrer Versuche möge genauer mitgeteilt werden. Am 12. November wurden zwei Birnen im Gewicht von 157 und 125 g in die Mitte des Glasgefäfses, ohne dafs sie sich berührten, gelegt; in dem Gefäfs befand sich noch Chlorcalcium, so dafs die Luft ganz trocken war. Das Gefäfs wurde dann dicht verschlossen, durch den Stopfen führte ein Leitungsrohr nach einem Quecksilberbehälter. Der Apparat wurde bis zum 19. Juli verschlossen gehalten. Während dieser Zeit wurden 1762 ccm Kohlensäure entwickelt, und die Früchte enthielten 2,62 g Alkohol. Die Birnen hatten ihre natürliche Farbe behalten; die Haut war runzelig, aber nicht feucht; sie sahen aus wie normale, welke Früchte. Die Untersuchung ergab, dafs sie 134 g Wasser abgegeben hatten, doch noch etwa 70 % ihres Gewichtes an Wasser enthielten. Gegen Ende des Versuches wurde die Entwickelung

Digitized by Google

von Kohlensäure geringer. Vom 3. März bis 8. April wurden nur 28 ccm dieses Gases entwickelt, von da ab hörte die Entwickelung ganz auf. Die Verfasser schlossen hieraus, dafs es ausgeschlossen sei, dafs die Gärung durch einen Alkohol bildenden Organismus bewirkt werde; überdies ergab die mikroskopische Prüfung des aus verschiedenen Stellen entnommenen Fruchtfleisches die Abwesenheit derartiger Organismen. Bei einigen Versuchen schlichen sich Hefensporen oder -zellen in das Fruchtfleisch ein; in diesen Fällen war aber der Verlauf der Gärung ein ganz anderer als der soben beschriebene: die Gärung ging, nachdem sie einmal eingesetzt hatte, immer weiter.

Während der spontanen Gärung wurde die Frucht wesentlich verändert; das Zellgewebe wurde ganz oder zum Teil gelockert; es wurde sirupartig, während die Samen ihre Keimfähigkeit verloren.

Die Versuche von *Lechartier* und *Bellamy* wurden in der Folge von *Pasteur* wiederholt, der deren Ergebnisse bestätigte.

Liefs man Früchte nach dem Ernten bei Luftzutritt lagern, so bildete sich bei dem Prozefs kein Alkohol. Die alkoholische Gärung in den beschriebenen Fällen war also zweifellos eine Folge der besonderen Versuchsbedingungen.

Weitere Untersuchungen, die *Brefeld* im Jahre 1875 und *de Luca* im Jahre 1878 mit Samen, Blättern und Zweigen anstellten, ergaben ganz ähnliche Resultate. Zu derselben Zeit fand *Müntz*, dafs bei der Kultur von Topfpflanzen in einer Stickstoff-, anstatt in einer Kohlensäure-Atmosphäre, ebenfalls in den lebenden Zellen Alkohol gebildet wird. Er machte seine Versuche mit verschiedenen Pflanzen: mit Mais, roten Rüben, Kohlarten und Cichorie, die alle während der Beobachtungsdauer gesund blieben. Er wies Alkohol in ihren Geweben durch die Jodoform-Reaktion nach.

Einige Versuche, die *Gerber* im Jahre 1896 anstellte, zeigten ebenfalls, dafs das Plasma der höheren Pflanzen alkoholische Gärung zu erregen vermag. Dieser Forscher prüfte die Vorgänge, die sich beim Reifen in einer Reihe von Früchten abspielen und legte besonderes Gewicht auf die während dieser Periode zu beobachtenden Atmungsvorgänge. Besonderes Interesse erweckt das Reifen von Früchten mit einem beträchtlichen Gerbstoffgehalt. Unter diesen ist besonders bemerkenswert die chinesische Dattel-

Digitized by Google

pflaume (Diospyros Kaki), die im reifen Zustande einen sehr angenehmen, flüchtigen, aromatischen Geruchsstoff enthält. Liefs man diese Frucht bei mangelhaftem Luftzutritt reifen, so enthielt das Fruchtfleisch 10 % Äthylalkohol, gemischt mit anderen Alkoholen, unter denen sich der Amylalkohol besonders bemerkbar machte. Das Fruchtfleisch enthielt auch Essigsäure. Das aromatische Prinzip war ein Gemisch von Äthyl- und Amylacetat, mit Spuren von Oenanthylaten und Pelargonaten. Der Gerbstoff verschwand beim Reifen, doch scheinen die gebildeten Alkohole nicht aus dem Gerbstoff entstanden zu sein, sondern vielmehr aus dem Zucker der Früchte. *Gerber* bringt die Bildung des Alkohols in Zusammenhang mit dem Luftmangel während der letzten Stadien des Reifeprozesses. Ähnliche Ergebnisse erhielt er mit Diospyros costata. Liefs man die Frucht dieser Pflanze bei 30° C. lagern, so war das Verhältnis des absorbierten Sauerstoffs zur entwickelten Kohlensäure 1 : 3,12; wurde die Temperatur bei 15° C. gehalten, so war das Verhältnis 1 : 1,26. Im ersteren Fall wurde Alkohol gebildet, im letzteren nicht. Die Gärung war offenbar auf den Umstand zurückzuführen, dafs die Sauerstoffzufuhr für den durch die höhere Temperatur bewirkten lebhafteren Stoffwechsel nicht genügend war, was aber bei der niedrigen Temperatur von 15° C. der Fall war. Bei dem Reifen dieser Früchte konnte folgendes beobachtet werden. In den ersten Stadien atmeten sie mehr Kohlensäure aus als sie Sauerstoff einatmeten; der Gerbstoff verschwand allmählich während dieser Periode, er wurde nach *Gerbers* Ansicht vollständig zu Kohlensäure und Wasser oxydiert. Nach dem Verschwinden des Gerbstoffes wurde die Pektose, die sich in den Zellwänden befand, in Pektin verwandelt, was durch die Erweichung des Fruchtfleisches in die Erscheinung trat. Durch das charakteristische Aufschwellen des Pektins wurden die Intercellulargänge im Fruchtfleisch zum Teil zerstört, wodurch die Luftzufuhr zu den inneren Zellen und damit die Sauerstoffzufuhr sehr gehindert wurde. Bei 15° C. genügte der durch die verengten Intercellulargänge hindurchgehende Sauerstoff für die Bedürfnisse der Zelle; bei 30° C. war dies jedoch nicht mehr der Fall; es trat eine Art Erstickung ein. Hierdurch wurde die bei dieser Temperatur beobachtete Gärung eingeleitet; die Ausatmung der Kohlensäure

Digitized by Google

nahm zu, und das Verhältnis der beiden Gase stieg von 1 : 1,26 auf 1 : 3,12. Die Kohlensäurezunahme rührte von der Vergärung des Zuckers her, wobei Kohlensäure gebildet wurde, die noch zu der Atmungskohlensäure hinzu kam. Bei niederer Temperatur war die ganze Kohlensäure lediglich Atmungskohlensäure. Diese Ansicht wurde noch durch folgenden Versuch gestützt: Liefs man mehr Luft zutreten, indem das Gewebe der Früchte in kleine Stücke zerschnitten wurde, so fiel das Verhältnis auf einmal; obwohl das Zerschneiden nicht das Verschwellen der Intercellulargänge verhinderte, war der Unterschied doch ganz beträchtlich.

Gerber erhielt ähnliche Ergebnisse mit Bananen und Melonen, die er unter gleichen Bedingungen beobachtete.

Er kam zu demselben Schlufs wie *Lechartier* und *Bellamy* und *Pasteur*, dafs die Ursache der alkoholischen Gärung in diesen Früchten in der verminderten Sauerstoffzufuhr zu den Zellen zu suchen sei, dafs sie in der That weiter nichts ist als ein Kampf gegen die beginnende Erstickung. Die Alkohole, die er erhielt, waren nicht frei, wie bei den Versuchen von *Lechartier* und *Bellamy*, sondern waren mit anderen flüchtigen Körpern zu ätherartigen Substanzen verbunden, die das Aroma der Früchte bilden.

Kehren wir nun zu der Rolle zurück, die die Hefenzellen bei der gewöhnlichen Gärung spielen, so ist diese schon vielfach der Gegenstand von Untersuchungen gewesen; zur Erklärung ihrer Wirkung sind zwei Hypothesen aufgestellt worden. *Pasteur* kam zu dem Schlufs, dafs die Gärkraft zur Ernährung ohne Sauerstoff in Beziehung steht und dafs in der Zersetzung des Zuckers unter diesen Bedingungen die Bemühungen dieses Organismus, sich Sauerstoff zu Atmungszwecken zu verschaffen, zum Ausdruck kommen. Wir sehen aus den Versuchen von *Monoyer*, dafs die Bildung von Glycerin und Bernsteinsäure, die *Pasteur* zuerst bei der alkoholischen Gärung nachwies, von dem Freiwerden einer kleinen Menge Sauerstoff begleitet ist. *Pasteur* wurde in seiner Ansicht bestärkt durch Versuche über die Kultur der Hefe in Gegenwart freien Sauerstoffs; daneben führte er andere aus, bei denen der Hefe Sauerstoff in reichlicher Menge zugeführt wurde. Er fand bei diesen Versuchen, dafs unter den beschriebenen Versuchsbedingungen das Gewicht der gebildeten Hefe und das des zersetzten Zuckers sehr verschieden war. Wurde kein Sauer-

Digitized by Google

stoff zugeführt, so war die Gärung sehr langsam, und es wurde nur wenig Hefe gebildet. Auf ein Teil gebildeter Hefe verschwanden 60—80 Teile Zucker. Bei Zufuhr von Sauerstoff war die Gärung sehr schnell, die Hefe wuchs reichlich, aber auf ein Teil gebildeter Hefe kamen nur 4—10 Teile zersetzter Zucker. Der Unterschied rührte im zweiten Fall nicht von irgend einer Schwächung der Energie der Hefe her; denn liefs man diese Hefe bei Abwesenheit von Sauerstoff auf Zucker einwirken, so verhielt sie sich genau wie die Hefe des ersten Versuches. *Pasteur* schlofs hieraus, dafs die Gärung ein Leben ohne Sauerstoff sei, und nahm an, dafs letzterer aus den Kohlenhydraten der Zelle selbst oder der Nachbarschaft gebildet werde.

Diese Ansicht erfuhr jedoch Widerspruch. *Schützenberger* kämpfte ziemlich heftig dagegen an, indem er ausführte, dafs *Pasteurs* Folgerungen nicht allen beobachteten Thatsachen Rechnung tragen. Bei Gegenwart freien Sauerstoffs findet eine lebhafte Gärung statt, während die Hefe verhältnismäfsig geringere Gärkraft besitzen soll. *Schützenberger* meint, dafs die Fähigkeit, Zucker zu zersetzen, nicht dasselbe sei wie die Fähigkeit, zu atmen, und dafs beide bei der Aufstellung einer Hypothese über die Natur des Vorganges aus einander zu halten seien. Die Hefezelle besitze beide Fähigkeiten, und so lange sie beide ungehindert ausübe, könne das Gärvermögen nicht mit dem Atmungsvermögen direkt in Beziehung gebracht werden. Wenn die Zersetzung des Zuckers nun das Resultat der Bemühungen der Hefezellen wäre, auf Kosten des im Zuckermolekül enthaltenen Sauerstoffs zu atmen, so müfste wahrscheinlich bei Gegenwart freien Sauerstoffs keine Gärung stattfinden können, oder aber sie müfste viel schwächer sein, wie im ersteren Falle, während aber gerade das Gegenteil gefunden wurde.

Schützenberger unternahm zur Begründung seiner Ansichten Versuche über die Beeinflussung der Atmung unter verschiedenen Bedingungen. Die erhaltenen Ergebnisse waren in Kürze folgende:

1. In einer wässerigen Flüssigkeit, die keinen Zucker, aber Sauerstoff gelöst enthält, ist die Menge des in der Zeiteinheit von einem Gramm Hefe absorbierten Sauerstoffs konstant, wie sonst auch immer die Menge des vorhandenen Sauerstoffs sein mag.

2. In einer Zuckerlösung, die Eiweiweifssubstanzen und Sauer-

Digitized by Google

stoff gelöst enthält, erhält man das gleiche Ergebnis, nur ist die Menge des in der Zeiteinheit absorbierten Gases grösser.

3. Führt man zwei Gärungen nebeneinander durch und versieht die eine unausgesetzt mit Sauerstoff, so wird im letzteren Falle mehr Alkohol gebildet. Hieraus schloss *Schützenberger*, dass der Zucker nur Nährstoff sei.

Betrachtet man alle diese Erscheinungen, die die verschiedenen Forscher beschrieben, im Zusammenhalt mit den von *Lechartier* und *Bellamy* und von *Gerber* mitgeteilten Thatsachen, so erscheint es möglich, diese beiden Hypothesen mit einander zu versöhnen. Wir können mit *Schützenberger* annehmen, dass, wenn die Hefenzelle unter normalen Bedingungen kultiviert wird, ihr besonderer Stoffwechsel eine gewisse kräftige Zersetzung zur Unterstützung der Ernährung nötig hat. Unter diesen Bedingungen wird sie reichlich mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Ihr Leben ist infolgedessen sehr lebhaft, die Zellen wachsen und vermehren sich und die gleichzeitig stattfindende Gärung ist äusserst kräftig. Man kann jedoch nicht ohne weiteres annehmen, dass ihr Plasma dem der Zellen von Früchten und anderer von den anderen Forschern beobachteter Organe gleicht. Wir sahen, dass das Verhältnis des Gaswechsels schnell geändert wurde, wenn freier Sauerstoff zu den Früchten nicht mehr hinzutreten konnte; die Kohlensäure vermehrte sich ums Doppelte und Dreifache. Die beginnende Erstickung veranlasst in ihnen eine Gärung, die sich durch Zunahme der entwickelten Kohlensäure bemerkbar macht; gleichzeitig tritt Alkohol auf. Ein ähnlicher Vorgang spielt sich bei der Hefe ab, wenn man sie des Sauerstoffs beraubt. Die beginnende Erstickung schwächt die Vermehrung der Hefezellen; das Gewicht der neu gebildeten Hefe beträgt nicht mehr $^1/_4$ bis $^1/_{10}$ des zersetzten Zuckers, sondern nur noch $^1/_{80}$. Zu gleicher Zeit wird die Gärung intensiver; zu dem bereits vorhandenen Ernährungsprozess kommt noch ein sogenannter Atmungsprozess hinzu. Der Unterschied zwischen der Hefe und den Früchten ist also der, dass der Ernährungsprozess der ersteren eine Alkoholbildung im Gefolge hat, der der letzteren dagegen nicht. Die erhöhte Gärthätigkeit der Hefe bei Luftabschluss entspricht nur dem Gärvermögen der Fruchtzellen, das nicht in die Erscheinung tritt, solange die Umgebung normal ist. Dass die Gärung der Hefe unter dem

Digitized by Google

Einflufs der beginnenden Erstickung intensiver ist, mag dem Versuch entgegen zu laufen scheinen, da die gewöhnliche Gärung bei Sauerstoffzutritt sehr kräftig erscheint. Aber die unter diesen Bedingungen mitwirkende Menge der Hefe ist viel gröfser, da sich die Zellen sehr rasch vermehren, was man bei Anstellen von vergleichenden Versuchen sehr wohl berücksichtigen mufs. Wir sehen, dafs im Anfang der Erstickung die Hefe das 80fache ihres Gewichtes an Zucker zu zersetzen vermag, dagegen bei Gegenwart von Sauerstoff nur das 4—10fache.

Wir sehen also, dafs die Thätigkeit der Hefe nicht immer die gleiche ist. Unter normalen Bedingungen erregt sie Gärung in Verbindung mit ihrer Ernährung. Es ist dies ein besonderer Fall, der, wie es scheint, auf Organismen von der Art der niederen Pilze beschränkt ist. Die Thätigkeit des Plasmas ist demnach eine viel gröfsere, wenn die Alkoholbildung mit dem Bestreben der lebenden Zelle zusammenfällt, sich mit dem ihrer Umgebung fehlenden Sauerstoff zu versorgen.

Von vielen Forschern wird der letztgenannte Prozefs als „intramolekulare Atmung" bezeichnet. Es ist dies ein nicht glücklich gewählter Ausdruck, denn der Vorgang hat nichts gemein mit dem engeren Atmungsprozefs. Letzterer besteht in der Aufnahme von Sauerstoff durch das Protoplasma und einer Reihe von Zersetzungen des letzteren, wobei unausgesetzt einfachere Körper gebildet werden; die äufsersten Zersetzungsprodukte sind Alkohol und Kohlensäure. Die bei der Atmung in Freiheit gesetzte Kohlensäure kommt also direkt aus dem Protoplasma. Bei dem Gärprozefs ist dies nicht der Fall; die Zersetzung scheint sich aufserhalb des protoplasmatischen Moleküls abzuspielen und zu dem Zwecke zu erfolgen, den für die Atmung der lebenden Substanz erforderlichen Sauerstoff aus einem aufserhalb befindlichen Körper frei zu machen. Der Prozefs ist im wesentlichen ein fermentativer und kein Atmungsprozefs.

Bei der Erörterung dieser Frage darf man jedoch nicht noch einen anderen sehr wichtigen Punkt vergessen. Während ihres Lebens benötigt die Hefe nicht nur des Nährstoffes für ihre Entwickelung und ihr Wachstum, sie mufs auch mit der zur Durchführung ihrer Lebensprozesse nötigen Energie versorgt werden. Es ist dies eine Grundnotwendigkeit für alle lebenden Organismen.

Digitized by Google

Von der Hefe wissen wir, dafs für ihr Wachstum und ihre Vermehrung eine Temperatur, die etwas höher ist, als Zimmertemperatur, aufserordentlich günstig ist, obwohl die „günstigste Temperatur“ nicht für alle Heferassen die gleiche ist. Die Konstanterhaltung dieser etwas höheren Temperatur bedingt eine weitere Energiezufuhr in Form von Wärme, und diese wird von der Hefe durch ihren Stoffwechsel erzeugt.

Normalerweise wird die Energie, deren eine aërobe, chlorophyllfreie Pflanze bedarf, zum gröfsten Teil durch den Atmungsprozefs besorgt. Das gleiche gilt für die Zellen grüner Pflanzen, die keine Chlorophyllkörperchen besitzen oder aber nicht in dem Mafse dem Lichte ausgesetzt sind, dafs sie imstande wären, strahlende Energie zu absorbieren. Beim Atmungsprozefs findet eine fortwährende Spaltung komplexer Körper in einfachere statt; bei diesen Spaltungen spielt das Plasma unmittelbar eine Rolle. Die lebende Substanz ist selbst der Sitz solcher Zersetzungen, die auch zu einem grofsen Teil aus dem Abbau und Wiederaufbau bestehen. Die Zersetzungen scheinen durch Sauerstoffzutritt zum Protoplasma bewirkt zu werden. Es ist allbekannt, dafs die Sauerstoffzufuhr die Beständigkeit einer Verbindung verringert. Das Endprodukt dieser Atmungsvorgänge ist die Bildung von Kohlensäure und Wasser, und die Zersetzungen sind zweifellos begleitet von dem Freiwerden von Energie.

Hat die Hefe eine genügende Sauerstoffzufuhr, so wird der Atmungsprozefs der gesunden Zellen durch die Zersetzung des Zuckers unterstützt, die ohne direkten Oxydationsprozefs Energie liefert. Findet keine oder nur unvollkommene Sauerstoffzufuhr statt, so bildet die Zuckerzersetzung die einzige Energiequelle für die Hefe. Es ist daher verständlich, dafs sich unter dem Druck beginnender Erstickung eine erhöhte Gärthätigkeit bemerkbar macht. Die Hefe zersetzt unter diesen Verhältnissen mehr Zucker, entweder zum Zwecke der Sauerstoffbeschaffung für die Atmung, oder zu dem Zwecke der direkten Beschaffung von Energie ohne Mithilfe der Atmung. Dieselbe Erklärung mag auch für die reifenden Früchte und die anderen bereits erwähnten Pflanzenteile gelten.

Bei den anaëroben Pflanzen mögen die bewirkten Zersetzungen in ähnlicher Weise eine allmähliche Sauerstoffversorgung des

Digitized by Google

Organismus bezwecken. Andererseits mögen sie die direkte Beschaffung der Energie zum Zwecke haben, ohne Mithilfe des aus dem zersetzten Körper freigemachten Sauerstoffes. In jedem Falle scheint die Beschaffung der Energie, die für die verschiedenen Lebensprozesse nötig ist, der Hauptzweck zu sein.

Die Art und Weise, wie die Hefenzellen den Zucker zersetzen, war bis vor ganz kurzem noch nicht aufgeklärt. Während der allmählichen Entwickelung unserer Kentnisse über die Enzyme wurden die Gedanken mancher Forscher auf die Frage nach der Existenz eines Enzyms gelenkt, das imstande wäre, die alkoholische Gärung zu bewirken. Man weiſs, daſs die Hefenzelle der Sitz verschiedener Enzyme ist. Wir haben bereits gesehen, daſs Invertase, Diastase, Glukase und Trypsin in der Hefe nachgewiesen sind. Bis zum Jahre 1896 jedoch schlugen alle Versuche, ein alkoholbildendes Enzym aus der Hefe darzustellen, fehl.

Claude Bernard war in den letzten Jahren seines Lebens mit dem Studium der Alkoholbildung im Safte von Weintrauben in verschiedenen Stadien der Reife und im Stadium der Überreife beschäftigt. Bei einigen seiner Versuche fand er, daſs die Alkoholmenge während des Reifens zunimmt, obwohl keine Hefe zugegen war, und er schrieb diese Thatsache der Wirkung eines Enzymes zu. Er konnte es aber nicht isolieren. Seine hinterlassenen Forschungen wurden nach seinem Tode von *Berthelot* im Juli 1878 veröffentlicht. Im Jahre 1896 aber gelang es *Buchner*, das Enzym zu isolieren und zwar nach folgender Methode.

Ein Kilogramm gewaschener, abgepreſster Hefe wurde mit dem gleichen Gewicht Quarzsand und 200 g Kieselguhr vermischt. Die Mischung wurde sorgfältig im Mörser zu einem feuchten Brei zerrieben. Unter dem Mikroskop erwiesen sich die meisten Zellen als zertrümmert oder doch wenigstens verletzt. Dann fügte man der teigigen Masse 100 ccm destilliertes Wasser zu. Das Ganze wurde dann in einen Beutel gegossen und in einer hydraulischen Presse unter starkem Druck ausgepreſst. Der Druck wurde allmählich bis auf 500 Atmosphären gesteigert. Auf diese Weise wurden 300 ccm Flüssigkeit ausgepreſst. Der Preſskuchen wurde dann mit weiteren 100 ccm destilliertem Wasser vermischt und abermals ausgepreſst, wobei aufs neue 150 ccm Preſssaft

Digitized by Google

erhalten wurden. Im Ganzen erhielt man also 250 ccm des Inhaltes der Hefenzellen. Die Flüssigkeit wurde mit 4 g Kieselguhr vermischt und durch feines Filtrierpapier filtriert. Das Filtrat war eine klare, schwach opaleszierende Flüssigkeit von gelber Farbe und roch schwach nach Hefe. Es hatte bei 17° C. ein spezifisches Gewicht von 1,046. Beim Vermischen eines kleinen Teiles dieser Lösung mit dem gleichen Volumen einer 37 prozentigen Rohrzuckerlösung kam in einer halben Stunde eine regelmäfsige Kohlensäureentbindung in Gang. Bei niedriger Temperatur war die Kohlensäureentwickelung langsam, bei 35° C. jedoch so lebhaft, dafs die Flüssigkeit schäumte.

Die Darstellung eines solchen Saftes ist mit beträchtlichen Schwierigkeiten verknüpft, da die Operation des Zerreibens der Hefe sehr mühsam ist. Nach der Veröffentlichung der *Buchner*-schen Versuche hat sie *Delbrück* in Berlin und der Verfasser in England mit Erfolg wiederholt.

Die Gärung wird durch ein Enzym im Hefenprefssaft verursacht, das *Buchner* mit dem Namen Zymase belegt hat. Der Name ist vielleicht nicht glücklich gewählt, da er bereits für die ganze Gruppe der „löslichen Fermente‘, angewendet wurde; doch sind letztere bereits mit dem Namen „Enzym“ belegt worden.

Die Zersetzung des Zuckers durch die Zymase besteht in einer Spaltung in Alkohol und Kohlensäure. Mischt man Hefenprefssaft mit vergärbarer Zuckerlösung in einer mit einem Manometer versehenen Flasche, so steigt das Quecksilber bald ins Rohr und wird darin durch den Druck einige Tage gehalten, wobei von Zeit zu Zeit Gasblasen durch die Quecksilbersäule entweichen. Nach einigen Tagen können aus der Flüssigkeit durch Destillation mefsbare Mengen Alkohol abgeschieden werden. Die Reaktion dauert an, bis aller Zucker zersetzt ist.

Der Prefssaft ist vollkommen wirksam, wenn er mit Chloroform gesättigt ist, das die Wirkung der Hefezellen selbst hindert. An Stelle des Chloroforms kann man auch antiseptische Stoffe anwenden. *Buchner* empfiehlt zu diesem Zweck das Kaliummetarsenit in der Menge von 2 g auf 100 ccm Lösung.

Chloroform bewirkt eine allmähliche Fällung der Eiweifsstoffe des Hefensaftes, die mechanisch einen grofsen Teil des Enzyms niederreifsen. Filtriert man eine solche Lösung und

Digitized by Google

suspendiert man den Niederschlag in ebenso viel Wasser als der Menge der filtrierten Flüssigkeit entspricht, so hat die Suspension eine viel gröſsere Gärkraft als das Filtrat, wie man nach der Zufügung von Zucker zu beiden Flüssigkeiten feststellen kann.

Erhitzt man die Lösung des Ezyms allmählich, so bildet sich bei 35—40° C. ein reichlicher Niederschlag; nach dem Abfiltrieren desselben besitzt das Filtrat keine Gärkraft mehr.

Der Preſssaft läſst sich sehr schwierig aufbewahren, da das Enzym sich sehr rasch zersetzt. Bei 0° läſst er sich 2—5 Tage aufbewahren, bei Zimmertemperatur wird er aber in der halben Zeit zerstört. In Berührung mit Zucker hält er sich nach *Buchner* bedeutend länger, er besitzt dann noch nach 2 Wochen etwas Gärkraft.

In einigen Fällen war der Preſssaft noch nach der Filtration durch Porzellan oder Kieselguhrfilter wirksam. Verschiedene Präparate jedoch weisen in dieser Beziehung ein verschiedenes Verhalten auf.

Das Enzym läſst sich, wie so viele andere, eintrocknen. Der Hefenpreſssaft wird unter Minderdruck zu einem dünnflüssigen Sirup eingedampft und dieser dann in dünner Schicht bei 35° C. weitergetrocknet. Der Trockenrückstand beträgt gewöhnlich etwa 10% des ursprünglichen Saftes. Er läſst sich drei Wochen unverändert aufbewahren. Wird er innerhalb dieser Zeit in dem fünffachen Gewicht Wasser gelöst und die Lösung filtriert, so enthält das Filtrat das Enzym in wirksamem Zustande.

Der Hefenpreſssaft oder die Zymase kann dieselben Zuckerarten vergären wie die Hefe selbst. *Buchner* vergor Rohrzucker, Maltose, Dextrose, Lävulose, aber nicht Laktose und Mannit. So weit unsere augenblicklichen Kenntnisse reichen, bildet sich bei der Gärung weder Bernsteinsäure, noch Glycerin, die beide bei der Gärung mittelst Hefe gebildet werden.

Zu Beginn seiner Untersuchungen fand *Buchner*, daſs das Enzym nicht aus jeder beliebigen Hefenprobe erhalten werden konnte. Viele andere Forscher, die genau nach seiner Methode arbeiteten, konnten es ebenfalls nicht erhalten.

Die gewöhnliche Bierhefe, der gärenden Würze am Ende der Gärung entnommen, giebt gewöhnlich das Enzym nicht. Entnimmt man jedoch die Hefe im Stadium der kräftigsten Entwickelung,

Digitized by Google

wenn die Gärung auf der Höhe ist, so kann man daraus beträchtliche Zymasemengen darstellen. In einer seiner früheren Abhandlungen spricht *Buchner* die Vermutung aus, dafs die Menge des Enzyms in verschiedenen Hefen wechseln kann, ebenso von Zeit zu Zeit in derselben Hefe. Die Sekretion findet scheinbar zeitweise statt und wird nur durch die Bedingungen hervorgerufen, unter denen die Hefezellen am kräftigsten wachsen und sich vermehren. Dies erinnert lebhaft an das Verhalten vieler Drüsen, z. B. der Magendrüsen, die ihr charakteristisches Enzym nur dann ausscheiden, wenn sie durch Nahrungsaufnahme dazu angeregt werden.

Seit *Buchners* Entdeckung wurde die Aufmerksamkeit wieder auf die Alkoholbildung in Früchten und anderen Pflanzenteilen gelenkt, wenn man diese des Sauerstoffs beraubt. *Effront* will kürzlich die Sekretion der Zymase in den Zellen, die die alkoholische Gärung in diesen Organen veranlassen, nachgewiesen haben. Seine ersten Versuche führte er mit Kirschen aus, die er durch Waschen mit verdünntem Formaldehyd sterilisierte. Sie wurden dann sorgfältig getrocknet und in Olivenöl eingetaucht. Nach drei Tagen konnte er eine beträchtliche Kohlensäureentwickelung beobachten, die drei Wochen lang anhielt. Nach Verlauf dieser Zeit wurden die Kirschen zerkleinert und der Saft ausgeprefst. Der Saft wurde durch Behandeln mit Äther entölt und dann bei niedriger Temperatur im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Pulver wurde 12 Stunden in Wasser eingeweicht und dann starkem Druck unterworfen. Der Prefssaft bewirkte nach der Filtration in Rohrzuckerlösung alkoholische Gärung; man konnte die Entwickelung von Alkohol und Kohlensäure und eine Verminderung des spezifischen Gewichtes der Flüssigkeit beobachten. Wurde der Saft eine Stunde vorher bei 40° gehalten, so bemerkte man in der Zuckerlösung keine Gärung.

Effront hat nach einer ähnlichen Methode Zymase aus Erbsen und Gerste dargestellt.

Nach diesen Versuchen erscheint es als sicher, dafs die Bildung des Alkohols, sei es in Gegenwart oder Abwesenheit von Sauerstoff, durch die Thätigkeit eines Enzyms bewirkt wird. Seine Ausscheidung durch die Hefenzellen begleitet den gewöhnlichen Ernährungsprozefs, ebenso wie die abnormalen Zersetzungen, die

Digitized by Google

bei beginnender Erstickung sich abspielen. Der letztere Zustand führt zu seiner Bildung in anderen Pflanzenteilen. Die Abwesenheit von Sauerstoff veranlafst das Protoplasma der Zellen zur Ausscheidung des Enzyms, zum Schlufs tritt seine Wirkung in der Beschaffung der Energie in die Erscheinung.

Digitized by Google

Kapitel XXI.

Das Fermentativvermögen des Protoplasmas.

Im einleitenden Kapitel dieses Buches sahen wir, dafs der Stoffwechsel der lebenden Zelle in zweierlei Weise in die Erscheinung tritt, einmal aufbauend, wobei aus einfachen Substanzen zusammengesetzte und zum Schlufs die lebende Substanz selbst gebildet wird, zum andernmale abbauend, charakterisiert durch die Zersetzung komplexer Substanzen zu schliefslich ganz einfachen Körpern. Wir sahen ferner, dafs viele der Abbauvorgänge durch Enzyme bewirkt werden, deren Wirkungsweise wir inzwischen kennen gelernt haben. Richten wir jedoch unsere Aufmerksamkeit hauptsächlich auf die intracellularen Vorgänge, so müssen wir sagen, dafs nicht alle diese Vorgänge auf die Wirkung von Enzymen zurückgeführt werden können. In der That ist ein sehr wichtiger Faktor beim Studium des intracellularen Mechanismus der Abbau des Plasmas selbst, oder, wie es *Pflüger* genannt hat, die „Selbstzersetzung" des Plasmas.

Die lebende Substanz mufs als der Sitz einer Reihe von chemischen Vorgängen betrachtet werden, von denen ein Teil aufbauender, ein anderer Teil abbauender Natur ist. Die Einverleibung der zu assimilierenden Eiweifsstoffe, Fette und Kohlenhydrate in die Substanz des Plasmas spielt sich fortwährend ab; sobald sich dieses aber gebildet hat, unterliegt es einer Art Selbstzersetzung, wobei sich die verschiedenartigsten Zersetzungsprodukte bilden, von denen einige wieder als neues Material dem Plasmamolekül einverleibt, während andere noch weiter abgebaut und schliefslich ausgeschieden werden.

Aber nicht nur die Substanz des Protoplasmas selbst unterliegt derartigen Zersetzungen, sondern auch verschiedene Substanzen in den Zellen zersetzen sich in gleicher Weise zu Pro-

Digitized by Google

dukten, die in die lebende Substanz in derselben Weise aufgenommen und einverleibt werden, wie die von deren Selbstzersetzung herrührenden. Wir finden, dafs in vielen Zellen Reservenährstoffe aufgespeichert sind, zwar nicht in einer direkt assimilierbaren Form, aber doch in einem Zustand, der ihren Abbau zu einer Nährsubstanz gestattet. Auch dienen diese Substanzen nicht nur als Nährstofflieferanten; durch ihre Zersetzung wird Energie erzeugt, die das Protoplasma zur Durchführung von Aufbauprozessen benötigt. Bei mangelhafter Sauerstoffzufuhr bewirkt das Protoplasma ebenfalls häufig derartige Zersetzungen wie wir im voraufgehenden Kapitel gesehen haben.

Diese Vorgänge sind gröfstenteils derselben Art wie die durch die Enzyme bewirkten Zersetzungen, und so sind wir berechtigt, von einer *fermentativen* Kraft des Protoplasmas zu sprechen.

Bei der Besprechung dieser Kraft oder Eigentümlichkeit der lebenden Substanz können wir uns auf die Fälle beschränken, in denen das Protoplasma verschiedene Körper zum Zwecke der Beschaffung von Nahrung für sich selbst, der Freimachung von Energie für seine verschiedenen Prozesse und zur Beschaffung des Sauerstoffs zur Atmung zersetzt.

Derartige Vorgänge können mehr oder weniger leicht in fast allen Organismen beobachtet werden, von den höchsten bis zu den niedersten, sowohl im Tier-, als auch im Pflanzenkörper.

Wir sahen, dafs die Leber der Säugetiere eine gewisse Menge Glykogen in ihren Zellen aufgespeichert enthält. Glykogen findet sich auch in den Muskeln des Rumpfes und der Glieder. Während des Lebens hat die ganze lebende Substanz Bedarf auf Kohlenhydratmaterial, das zum Teil durch Zersetzung des Glykogens beschafft wird. In einem früheren Kapitel sahen wir, dafs das Glykogen der Leber wahrscheinlich von einem in der Substanz des Zellplasmas erzeugten Enzym in Zucker verwandelt wird. Viele Physiologen jedoch glauben, dafs dieses nicht das einzig wirksame Prinzip bei dieser Umbildung ist, sondern dafs auch ein Teil des Glykogens durch das Protoplasma selbst hydrolysiert wird. Das gleiche scheint bei den Muskeln der Fall zu sein, denn diese geben an einen Auszug höchstens Spuren von Diastase ab.

Digitized by Google

Der Aufbrauch des aufgespeicherten Fettes in den verschiedenen fettführenden Geweben scheint auf eine ähnliche Ursache zurückzuführen zu sein. Das Fett unterstützt nicht nur die Ernährung der Zellen, in denen es aufgespeichert ist, sondern auch der übrigen Teile des Körpers. Es mufs zu diesem Zwecke von dem Ort der Ablagerung entfernt werden, und dieser Entfernung mufs mit ziemlicher Sicherheit zur Erleichterung des Transportes seine Zersetzung voraufgehen. Das Enzym Lipase ist jedoch keineswegs immer in fettführenden Zellen zugegen.

Auf andere Nährstoffe wirkt ebenfalls das Protoplasma ein. Im Hungerzustand vermindert sich die Substanz des Körpers nicht gleichmäfsig; das Fett verschwindet schneller, und das Muskelgewebe wird erst sehr mitgenommen, ehe das Hirn angegriffen wird. Von den Muskeln werden die Herzmuskeln viel später als die des Rumpfes und der Glieder angegriffen. Letztere werden thatsächlich verdaut zur Ernährung der anderen Gewebe, und die wichtigeren Herzmuskeln erhalten Nahrung aus solchen, die leichter entbehrt werden können. Die lebende Substanz mufs daher imstande sein, die Eiweifsstoffe der verschiedenen Körperteile abzubauen, wenn ähnliche Stoffe, die normalerweise durch die Nahrung zugeführt werden, fehlen.

Der Pflanzenorganismus liefert uns mehr Beispiele für diese Fähigkeit des Plasmas als der Tierkörper. Was vielleicht bei letzterem die Ausnahme ist, erscheint bei den Pflanzen die Regel zu bilden. Die Fähigkeit des Protoplasmas, Zerfall der Kohlenhydrate zu bewirken, kann man bei dem Abbau und Wiederaufbau der transitorischen Stärke beobachten, der in verschiedenen Teilen der höheren Pflanzen fortwährend sich abspielt, obwohl hier zweifellos auch in vielen Fällen die Diastase eine Rolle spielt. Das gleiche kann man bezüglich der Veränderungen, die die verschiedenen Zucker in den höheren Pflanzen erleiden, beobachten. Die verschiedenen Säuren, die einen normalen Bestandteil des Zellsaftes des saftigen Parenchyms ausmachen, werden wahrscheinlich, wenn nicht sicher aus dem Zucker in den Zellen gebildet. *Kohl* vermutet, dafs sie in derselben Weise gebildet werden, wie die Milchsäure bei gewissen Bakterien-Gärungen. Diese Säuren sind gewöhnlich nicht so einfach, wie die durch die Bakterien gebildeten; wir finden Apfelsäure, Citronensäure,

Digitized by Google

Weinsäure u. s. w. statt Essigsäure, Milchsäure, Buttersäure u. s. w. Das mag jedoch mit dem Charakter des Stoffwechsels der zwei in Frage kommenden Klassen von Zellen zusammenhängen, denn die Wirkung ist in beiden Fällen eine intracellulare.

Die intracellulare Verdauung der Eiweifsstoffe in Abwesenheit eines Enzyms kann bei der Kartoffelknolle beobachtet werden. Der äufsere Teil des Knollens enthält Eiweifskrystalle von kubischer Form; das Eiweifs ist wahrscheinlich ein Globulin. Zu Beginn der Keimung der Knollen verschwinden diese Krystalle; sie werden zur Ernährung des jungen Schöfslings verbraucht.

Das Fermentativ-Vermögen des Protoplasmas auf Cellulose kann in fast allen wachsenden Zellen von unregelmäfsiger Gestalt beobachtet werden. Bei der Entwickelung von Ästen auf den Hyphen verschiedener Arten von Botrytis führt die Anhäufung von Cytase an den Verzweigungspunkten zu einer Erweichung der Zellwande an diesen Stellen, dann bewirkt der hydrostatische Druck in den Hyphen ihre allmähliche Erweiterung. Die Form solcher Zellen, wie z. B. der sternförmigen Haare auf den Blättern von Deutzias läfst sich nur durch die Annahme erklären, dafs das Protoplasma die Zellwände der ursprünglich fast kugelförmigen Zellen an gewissen Stellen zu erweichen vermag, so dafs sie an diesen Stellen sich leichter dehnen lassen als auf der übrigen Blattoberfläche. Der hydrostatische Druck verursacht an den erweichten Stellen Auftreibungen, die die Form des reifen Haares bedingen.

Weniger gut erkannte Fälle sind häufig im Innern des Pflanzengewebes. Die cytolytische Wirkung des Protoplasmas ist offenbar dieselbe wie die von der Cytase bewirkte Erweichung.

Noch bis in die neueste Zeit wurden die Gärungen in reifen Früchten, wie sie *Lechartier* und *Bellamy*, *Pasteur* und *Gerber* nachgewiesen haben, auf diese Eigenschaft des Protoplasmas zurückgeführt. *Effronts* Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dafs sie auf die Wirkung der Zymase zurückzuführen sind.

Auch bei den niederen Lebewesen finden wir eine ähnliche Eigenschaft des Protoplasmas. Die Leukocyten des Blutes der Wirbeltiere können in gewisser Beziehung als unabhängige Körper betrachtet werden, die ihre Ernährung selbst bewirken können. *Matschnikoff* beobachtete, dafs gewisse dieser Körperchen, die er

Digitized by Google

Phagocyten nannte, imstande sind, Bakterien, die ihren Weg in den Blutstrom genommen haben, aufzunehmen und zu verdauen. Die Bakterien selbst können eine grofse Anzahl ähnlicher Zersetzungen bewirken; viele derselben bewirken ganz spezifische Gärungen. In einigen Fällen ist nachgewiesen, dafs sie diese Umwandlungen mit Hilfe von Enzymen bewirken, dies ist jedoch durchaus nicht allgemein der Fall. Man mufs daher das Protoplasma als die Ursache dieser Zersetzungen ansehen. Verschiedene Prozesse der intracellularen Verdauung, die sich in den Hyphen von Mucor und anderen Fadenpilzen abspielen, erheischen eine ähnliche Erklärung.

Der Einflufs des Sauerstoffmangels auf den Stoffwechselprozefs der Pflanzen wirft weiterhin Licht auf diese Eigenschaft. Man hat oft Gelegenheit, zu beobachten, wie tiefgehend der gewöhnliche Stoffwechselprozefs verändert wird, wenn die freie Sauerstoffzufuhr gehindert ist. *Böhm* und später *de Luca* zeigten, dafs bei mangelhafter Versorgung irgend eines lebenden Teiles einer lebenden Pflanze mit Sauerstoff sich manchmal Wasserstoff und Sumpfgas entwickeln. *Boussingault* und *Schulz* haben ähnliches beobachtet. Pflanzen, die Mannit enthalten, geben ebenfalls Wasserstoff ab, während nach *de Luca* aus der Apfelsäure der Früchte, Blüten und Blätter des Hartriegels Essigsäure gebildet wird. *Böhm* fand ferner, dafs bei der Zersetzung der Eiweifsstoffe Ammoniak ausgeatmet wird.

Wie bereits erwähnt, bewirken viele Mikroorganismen ohne Ausscheidung eines Enzyms spezifische Gärungen; mehrere derselben sollen hier kurz betrachtet werden. Zunächst sollen die besprochen werden, die bei ihrem normalen Stoffwechsel verschiedene Säuren bilden. Im Zusammenhang hiermit möge auch die Fäulnis besprochen werden.

Milchsäuregärung.

Das häufige Auftreten von Milchsäure in zuckerhaltigen Flüssigkeiten ist schon früh beobachtet worden. Sie bewirkt die Gerinnung der Milch beim Stehen der letzteren an der Luft; daher rührt auch der Name der Säure. Die Milchsäure wurde zum erstenmal von *Scheele* aus der Molke im Jahre 1780 dargestellt. Die Säure wird jedoch nicht ausschliefslich aus Milch-

Digitized by Google

zucker gebildet, sondern auch aus Dextrose und allen Substanzen, die in Dextrose übergeführt werden können. *Braconnot* fand sie in der Flüssigkeit, die durch Einweichen von Reis in Wasser erhalten war; ebenso im Saft der Zuckerrübe und in Aufgüssen von Erbsen und anderen Leguminosensamen. Aus den Polysacchariden bildet sie sich schwieriger als aus den Glukosen. Laktose, die dieser Gruppe angehört, unterliegt leichter der Milchsäuregärung als der alkoholischen Gärung. *Bourquelot* fand, dafs der Bildung der Milchsäure keine Hydrolyse voraufgeht. Die Vorgänge bei der Milchsäuregärung können durch folgende Gleichung veranschaulicht werden: $C_6H_{12}O_6 = 2\ C_3H_6O_3$; und bei den Polysacchariden: $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 4\ C_3H_6O_3$; letzteres ist die Formel für die Milchsäure.

Aufser aus den erwähnten Zuckern entsteht Milchsäure auch noch aus Sorbit, Inosit, Mannit und Dulcit; auch Apfelsäure liefert unter gleichzeitiger Entwickelung von Kohlensäure Milchsäure nach der Gleichung $C_4H_6O_5 = C_3H_6O_3 + CO_2$. Sie entsteht auch bei der Buttersäuregärung mancher Kohlenhydrate.

Die Milchsäuregärung wird durch viele Arten von Mikroben veranlafst, einschliefslich der Eiterbakterien, Micrococcus prodigiosus, Eberths Bacillus, Bacterium coli commune und anderen. Die wirksamste Form, die am häufigsten in der sauren Milch angetroffen wird, ist das von *Pasteur* beobachtete und beschriebene Bacterium acidi lactici.[1] Diese Mikroben er-

[1]) Ein starkes Milchsäure bildendes Bakterium ist auch Pediococcus acidi lactici, von *Lindner* aus Malzmaischen isoliert. Der Durchmesser der einzelnen kugeligen Zellen beträgt 0,6—1 μ. Die Kugel entwickelt sich zum Diplokokkus und zur Tetrade. Optimumtemperatur 40° C. Der Organismus ist sehr empfindlich gegen höhere Temperaturen. 20 Minuten langes Verweilen bei 56° C. wirkte schon tödlich, während nach 10 Minuten noch Keime lebend blieben. Vor dem stäbchenförmigen Milchsäureferment (Bac. Delbrücki) zeichnet es sich durch Bildung ziemlicher kräftiger Bodensätze aus. Versuche in der Praxis sind aber mit ihm bisher noch nicht gemacht worden. In einer Malzextraktlösung von 14% Balling entwickelte der Pediococcus bei 40° C. im Laufe von 2 Tagen eine Säuerung, die 0,7% Milchsäure entsprach (zur Neutralisation von 20 ccm Flüssigkeit waren 15,5 ccm $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge nötig). In einer Malzroggenmaische bei denselben Temperaturen stieg die Säuerung bis auf 2 cc. N. N. auf 20 ccm. Bei gewöhnlicher Temperatur schreitet die Säurebildung nur ganz minimal fort. In Weifsbierwürze von 14% Balling waren nach 14 Tagen 0,3 cc. N. N., nach 11 Monaten 0,7 cc. zur

Digitized by Google

scheinen unter dem Mikroskop als runde Kügelchen oder kurze Stäbchen, die in der Mitte etwas eingeschnürt sind; im allgemeinen sind sie getrennt, manchmal aber bilden sie Ketten von zwei bis drei Zellen. Sie können Sporen bilden, die sich in ihren äufseren Enden vorfinden. Diese Sporen sind gegen Hitze sehr widerstandsfähig.

Der Mikrob ist aërob und braucht beträchtliche Mengen Sauerstoff. Durch Sauerstoffabschlufs wird er getötet. Am besten gedeiht er in einer neutralen Flüssigkeit; bei seiner Kultur ist es deshalb ratsam, der Milch oder Zuckerlösung etwas gepulverte Kreide zuzusetzen. Diese neutralisiert die Milchsäure sofort nach ihrer Bildung, und die Gärung wird nicht gehemmt. Ein alkalisches Medium ist seiner Thätigkeit ebenfalls ungünstig. Führt man die Gärung durch, ohne die gebildete Milchsäure zu neutralisieren, so setzt sie aus, sobald etwa 8 % Milchsäure gebildet sind.

Zur Kultur des Milchsäurebakteriums ist aufser dem Zucker noch Stickstoffnahrung nötig. Es wächst am besten bei einer Temperatur von 35° C.[1])

Neutralisation von 20 cc. erforderlich. (*Lindner*, „Mikroskopische Betriebskontrolle“ 1898.) Der Pediococcus viscosus ist ebenfalls ein ziemlich starker Milchsäurebildner, jedoch schon bei gewöhnlicher Temperatur, im Gegensatz zu dem vorigen. 100 cc. klare Weifsbierwürze, mit ihm geimpft, brauchte nach 18 Tagen bereits 16 cc. N. N. zur Neutralisation von 20 cc. Die Würze trübt sich anfänglich, später setzt sich ein schön weifses Sediment ab. Die darüber stehende Flüssigkeit ist völlig leicht beweglich; sie wird jedoch sofort fadenziehend, sobald das Sediment aufgerührt wird. In derselben 14 prozentigen Weifsbierwürze, in welcher obiger Pediococcus acidi lactici nur eine 0,3 cc. N. N. entsprechende Säuremenge produziert hatte pro 20 ccm, entwickelte der Pediococcus viscosus eine 1,5 cc. N. N. entsprechende Säuremenge. In älteren Kulturen verliert der Bodensatz seine schleimige Beschaffenheit und zeigt so dasselbe Verhalten, welches die langgewordenen Weifsbiere aufweisen. (Wochenschrift f. Brauerei 1889 p. 182 und *Lindner*, Mikroskop. Betriebskontrolle 1898 p. 349.) W.

[1]) An dieser Stelle sind noch folgende Arbeiten zu erwähnen: *Delbrück*, Bereitung der Kunsthefe. Zeitschrift für Spiritusindustrie 1877, S. 70. — *Delbrück* und *Stumpf*: Über die Bildung von Säure durch die Entwickelung des Milchsäurefermentes in der Kornschlämpe. Zeitschrift für Spiritusindustrie 1878, S. 3. — *Delbrück:* Die Veränderung der Eiweifskörper während des Säuerungsprozesses der Kunsthefe. Zeitschrift für Spiritusindustrie 1878, Extranummer S. 8. — *Delbrück*, Säuerung des Hefengutes. Zeitschrift für Spiritus-

Digitized by Google

Man hat die Milchsäure oft im Magen der Säugetiere während der Verdauung gefunden, und über ihre Entstehung ist schon viel diskutiert worden. Manche Forscher halten sie für ein Produkt der Bakterienwirkung. Andere wieder, darunter auch *Hammarsten*, sind der Ansicht, dafs sie durch ein bestimmtes Enzym der Magenschleimhaut gebildet werde. Man hat Magenauszüge mit Natronlauge behandelt in einer Menge, dafs sowohl das Pepsin als auch das Labenzym vernichtet wurden. Nach Entfernung der Natronlauge konnte die Flüssigkeit Milchzucker noch in Milchsäure verwandeln. Das Enzym ist jedoch bislang noch nicht isoliert worden. *Metz* fand, dafs bei der Vergärung der Dextrose in Gegenwart der Magenschleimhaut des Schweines eine Abart der Milchsäure gebildet wird. Seine Versuchsbedingungen schliefsen jedoch nicht die Möglichkeit aus, dafs Mikroorganismen zugegen waren. Andere Forscher schrieben die gleiche Eigenschaft der Magenschleimhaut der Herbivoren zu.

Die Buttersäuregärung.

Gewöhnlich findet bei der Säuerung der Milch eine Buttersäurebildung statt, die auf Kosten der zuerst gebildeten Milchsäure zu entstehen scheint. Das hauptsächlichste Agens bei ihrer Bildung ist ein besonderer Mikrob, der von verschiedenen Forschern Clostrydium butyricum, Vibrio butyricus, Amylobacter clostrydium und Bacillus amylobacter genannt wurde. Er besteht aus dünnen, cylinderförmigen Stäbchen, die gelegentlich zu kurzen Ketten vereinigt sind. Manchmal sieht man sie in lebhafter Bewegung; manchmal finden sie sich auch zu Zooglöen vereinigt. Sie sind oft recht unregelmäfsig geformt; sie bilden Sporen, in jeder Zelle eine, aber in der Mitte des Längsdurchmessers, wodurch das Stäbchen ein etwas eigenartiges Aussehen erhält.

Der Organismus ist sehr verbreitet und begleitet oft das Milchsäurebakterium. In seinen Lebensbedingungen unterscheidet es sich von diesem dadurch, dafs es anaërob ist und leicht durch Gegenwart von freiem Sauerstoff getötet wird.

---

industrie 1881, S. 1, 14 u. 197. — *Hayduck:* Über Milchsäuregärung. Zeitschrift für Spiritusindustrie 1887, Ergänz.-Heft I, S. 84.

Digitized by Google

Dieser Organismus bildet Buttersäure, nicht nur aus Milchsäure oder Körpern, aus denen diese Säure entsteht, z. B. Zucker und Stärkederivaten, sondern auch aus höheren Säuren, z. B. Weinsäure, Citronensäure, Apfelsäure und Schleimsäure. Die Art der Zersetzung dieser Substanzen durch das Buttersäurebakterium ist etwas komplexer Natur; gewöhnlich entwickelt sich dabei nicht nur Kohlensäure, sondern auch Wasserstoff. Nach *van Tieghem* kann es auch gewisse Cellulosearten oder die mit diesen verbundenen Pektinkörper zersetzen, insbesondere die Mittellamelle der Zellen vieler Gewebe. Stärke greift es jedoch nicht an.

Der Bacillus findet sich regelmäfsig im Darmkanal der Tiere, besonders der Pflanzenfresser. Er spielt zweifellos bei der Verdauung der Cellulose im Säugetierkörper eine sehr wichtige Rolle. *De Bary* ist der Ansicht, dafs diese Verdauung in zwei Phasen vor sich geht; zuerst findet durch ein cytolytisches Enzym eine Hydrolyse der Cellulose statt, wobei Dextrin und Dextrose gebildet wird, die dann ihrerseits der Buttersäuregärung unterliegen.

Aufser dem Bacillus amylobacter vermögen noch viele andere Organismen Buttersäuregärung zu veranlassen; u. a. der Bacillus butylicus von *Fitz*, der Glycerin unter Bildung von Kohlensäure, Wasserstoff, Butylalkohol, Buttersäure, Milchsäure, Propylenglycoll und Spuren von zwei weiteren Alkoholen zu vergären vermag. Dieser Bacillus ist einer der wenigen, die Invertase ausscheiden.

Hueppes Bacillus ist eine weitere interessante Form, insofern als er nicht nur aus Laktaten Buttersäure bildet, sondern auch Gelatine verflüssigt und die Enzyme Pepsin und Trypsin ausscheidet.

Bacillus aethylicus ruft in dünner Stärkelösung Buttersäuregärung hervor, wenn man die Lösung durch zugesetztes Kreidepulver neutral erhält. Der Gärung geht eine Hydrolyse der Stärke vorauf, die durch eine von Mikroben ausgeschiedene Diastase bewirkt wird. Die Bildung der Buttersäure ist in diesem Falle direkt; man beobachtet nicht Milchsäure als Zwischenprodukt.

Von anderen Körpern, die durch verschiedene Mikroben in Buttersäuregärung versetzt werden, seien genannt: Mannit, Quercit und Glycerin. Die günstigste Temperatur für die Buttersäuregärung liegt etwas höher als die der Milchsäuregärung, bei 39 bis 40° C.

Digitized by Google

Bei der Buttersäuregärung laufen gewöhnlich noch Nebenreaktionen einher. Der entstehende Wasserstoff veranlafst häufig Reduktionsprozesse unter den vorhandenen Körpern. Unter diesen lassen sich häufig Bernsteinsäure und Baldriansäure nachweisen.

Die Propionsäuregärung.

Unter der Einwirkung gewisser Bacillen unterliegt milchsaurer Kalk einer besonderen Zersetzung, wobei die Milchsäure in verschiedene Fettsäuren, darunter Essigsäure und Baldriansäure, in der Hauptsache aber Propionsäure, übergeht. Diese Zersetzung wurde zuerst von *Strecker* im Jahre 1854 in einer mehrere Monate bei niederer Temperatur gehaltenen Gärflüssigkeit entdeckt. *Fitz* beschrieb einen Bacillus, der diese Zersetzung zuwege bringt; er ist ein langer, dünner Organismus, der geschweifte Ketten aus den an den Enden zusammenhängenden Zellen bildet. Bei der Gärung spaltet sich die Milchsäure in zwei Teile Propionsäure, wobei gleichzeitig ein Teil Essigsäure, Kohlensäure und Wasser gebildet wird. Von der Buttersäuregärung derselben Säure unterscheidet sich diese Gärung dadurch, dafs kein Wasserstoff gebildet wird.

Ein anderer Bacillus, ebenfalls von *Fitz* studiert, zersetzt die Apfelsäure fast in die nämlichen Produkte, doch ist die Menge der gebildeten Propionsäure verhältnismäfsig gröfser; auch werden gleichzeitig Spuren Buttersäure und Alkohol gebildet.

Die Citronensäuregärung.

Im Jahre 1892 zeigte *Wehmer,* dafs aus der Dextrose unter Umständen Citronensäure entsteht; diese Umwandlung wird durch zwei besondere Arten von Schimmeln oder Fadenpilzen bewirkt, denen ihr Entdecker die Namen Citromyces pfefferianus und Citromyces glaber gab. Sie bilden auf der Oberfläche geeigneter Lösungen dichte Mycelhäute von grüner Farbe, etwa 5 mm dick. Am besten entwickeln sie sich in Dextroselösung, sie sind jedoch nicht ausschliefslich auf diesen Zucker angewiesen. Bei der Gärung entwickelt sich Kohlensäure, und die gebildete Citronensäure ist in Eigenschaften und Zusammensetzung identisch mit der Säure der Citronen. Unter gewissen Bedingungen erhält man mehr als 50 % der Dextrose an Citronensäure. Elf Kilo=

Digitized by Google

gramm Zucker lieferten bei einem Versuche sechs Kilogramm reiner Citronensäure ohne Bildung weiterer Nebenprodukte. Um diese Ausbeute zu erzielen, mufs man jedoch die Citronensäure bei einem gewissen Prozentgehalt fällen, da eine 20prozentige Lösung der Säure dem Pilz schadet und sein Wachstum schädigt.

Der Pilz kann die Gärung bei Luftabschlufs nicht einleiten; auch durch Anhäufung gröfserer Mengen Kohlensäure, die sich während des Prozesses entwickelt, wird er geschädigt. Er ist unabhängig vom Licht, die Temperatur mufs jedoch sorgfältig geregelt werden.

Unorganische Säuren sind der Gärwirkung des Pilzes sehr nachteilig, neutrale Chloride hingegen fördern die Bildung der Citronensäure.

Läfst man die Gärung zu weit gehen, dann wird die Citronensäure selbst angegriffen und zersetzt.

Der Säurebildungsprozefs ist nicht einheitlich; er verläuft jedoch nach dem Bilde einer sehr rasch ansteigenden und abfallenden Kurve, die zu dem Grad der durch den Pilz bewirkten Zersetzung des Zuckers in enger Beziehung steht.

Im Zusammenhang mit dieser Gärung ist es interessant, dafs sich im Safte des Zuckerrohres gelegentlich Citronensäure vorfindet, was auf eine Wirkung des Protoplasmas der Zellen des letzteren ähnlich der des in Rede stehenden Pilzes schliefsen läfst.

Die Oxalsäuregärung.

Mehrere Pilze, besonders Penicillium und Sclerotinia liefern bekanntlich bei ihrer Kultur in Zuckerlösungen Oxalsäure. Dieselbe Fähigkeit wohnt auch gewissen Saccharomyceten inne, unter denen *Zopf* einen, den Saccharomyces Hansenii, beschrieben hat. Bei seiner Kultur in Bierwürze, Zucker- oder Mannitlösungen bildet er auf der Oberfläche eine Haut, die bald zu Boden sinkt. Fügt man zur Neutralisation der gebildeten Säure Kreide zu der Kulturflüssigkeit, so bilden sich grofse Mengen von oxalsaurem Kalk. Die Hefe kann aus Galaktose, Dextrose, Rohrzucker, Laktose und Maltose Oxalsäure bilden, ebenso aus Dulcit, Mannit und Glycerin.

Die Oxalsäuregärung unterscheidet sich in manchen Punkten scharf von der Citronensäuregärung. Während letzterer etwas

Digitized by Google

erhöhte Temperatur und die Gegenwart neutraler Chloride förderlich ist, zerstören sie bei der Oxalsäuregärung die Oxalsäure und verhindern eine Anhäufung derselben in der Kulturflüssigkeit.

Aufser diesen Gärungen sind noch viele andere beobachtet worden, bei denen verschiedene Mikroben in Betracht kommen; doch sind letztere in morphologischer Beziehung nicht genau studiert, ebensowenig wie die Natur der von ihnen bewirkten Zersetzungen. Viele dieser Gärungsvorgänge sind offenbar sehr verwickelter Natur; mehrere verschiedene Mikroben nehmen entweder gleichzeitig oder nacheinander daran teil, und viele Zwischenreaktionen spielen sich unter den verschiedenen Gärungsprodukten ab.

Ein besonderer Bacillus soll die Apfelsäure unter Bildung von Bernsteinsäure und Essigsäure zersetzen, wobei aufserdem noch Kohlensäure und Wasser gebildet werden. Andere, die sich im Heu vorfinden, vergären den Erythrit zu Buttersäure und Spuren Ameisen- und Essigsäure. Andere wieder spalten den Erythrit in Buttersäure, Essigsäure, Capronsäure und Bernsteinsäure, sowie Spuren von Alkohol. Auch Glycerin kann aufser von dem bereits erwähnten Buttersäuremikroben auch noch von mehreren dieser Organismen gespalten werden. Man kennt einen besonderen Mikrokokkus, der es langsam unter Bildung von Äthyl- und anderen Alkoholen, Buttersäure, Ameisensäure und Essigsäure spaltet. Die zuletzt genannten beiden Säuren bilden sich in nur geringer Menge. Der Eiterbacillus, Bacillus pyocyaneus, bildet aufserdem noch Bernsteinsäure. Gewisse andere Mikroorganismen zersetzen das Kalksalz der Chinonsäure; einige anaërobe Formen bilden daraus Ameisensäure, Essigsäure und Propionsäure, andere aërobe Formen oxydieren sie zu Brenzkatechusäure. Aufserdem kennt man noch mehrere andere Gärungen ähnlicher Art.

Die Essigsäuregärung.

Läfst man alkoholhaltige Flüssigkeiten an der Luft stehen, so werden sie schnell von Bakterien angegriffen. Ganz bald findet man, wenn die Konzentration des Alkohols nicht zu grofs ist, Häute auf der Oberfläche der Flüssigkeit, die manchmal dünn

Digitized by Google

und zart und leicht zerbrechlich bleiben, manchmal aber eine beträchtliche Dicke erreichen. In manchen Fällen ist die Bildung der Haut begleitet von einem Wachstum des Organismus in der Flüssigkeit, wobei sich eine grofse Menge einer zähen Substanz bilden kann. Gleichzeitig wird der Alkohol in der Flüssigkeit zum Teil oder ganz in Essigsäure verwandelt.

Persoon nannte die Haut im Jahre 1822 Mycoderma; er erkannte ihre pflanzliche Natur, und indem er ganz richtig schlofs, dafs sie eine Art Pilz sei, benannte er sie demgemäfs.

Kützing nahm den Gegenstand im Jahre 1837 wieder auf; nach seiner Beschreibung besteht der Organismus aus einer Anzahl kleiner runder Körper, die miteinander zu Ketten vereinigt sind. Er war der erste Forscher, der erkannte, dafs die Bildung der Essigsäure mit der Gegenwart des Mikrobes verknüpft war. Er klassifizierte letzteren irrtümlicherweise unter die Algen und nannte ihn Ulvina aceti.

Ums Jahr 1821 wurde der Essigbildungsvorgang zuerst klarer erkannt. Vorher wufste man nur ganz allgemein, dafs Essigsäure aus dem Alkohol gebildet wurde, und dafs für den Prozefs der Zutritt von Luft notwendig ist; doch kannte man keine Gründe für die Erscheinungen. *Lavoisier* stellte fest, dafs die Essiggärung durch Aufnahme von Sauerstoff aus der Luft bewirkt wird. Im Jahre 1821 entdeckte *Edmund Davy*, dafs Platinschwarz beim Befeuchten mit Alkohol ins Glühen gerät und der Alkohol hierbei zu Essigsäure oxydiert wird. Seine Entdeckung wurde zwei Jahre später von *Doebereiner* bestätigt, der sie weiter ausbaute und zeigte, dafs Alkohol Sauerstoff aufnimmt und zu Essigsäure und Wasser oxydiert wird.

Von den meisten Forschern nach *Doebereiner* wurde die Haut der Mycoderma mit dem Platinschwarz verglichen, sie sollte die Zersetzung in die Wege leiten und ähnlich wirken wie das Platinschwarz. *Berzelius* behauptete im Jahre 1829, dafs die Wirkung der Essighaut auf die darin eingeschlossene Essigsäure zurückzuführen sei. *Liebig* hielt die Mycoderma für leblos, für eine strukturlose Eiweifsfällung; er glaubte, sie sei eine poröse Substanz, ähnlich dem Platinmohr, und ihre Wirkung sei durch ihre Porosität und den darin eingeschlossenen Sauerstoff bedingt. Er glaubte, dafs die Bildung der Essigsäure durch eine Bewegung

Digitized by Google

oder Vibration zuwege gebracht werde, die die in der Zersetzung begriffene Substanz einleite, wie er es im Falle der alkoholischen Gärung annahm. Die Vibration bewirke im vorliegenden Fall die Oxydation des Alkohols.

Selbst *Pasteur* übersah die Rolle, die der Organismus in Wirklichkeit spielt. Er erkannte das zutreffende der *Kützing*schen Untersuchungen an und zeigte durch den Versuch, dafs die Ansicht des letzteren in Bezug auf die Funktion der Mycoderma zutreffend sei. Er war jedoch auch wieder mit *Liebig* der Ansicht, dafs der Pilz nach der Art des Platinmohres wirke. Er zeigte ferner, dafs nicht nur der Alkohol während der Thätigkeit des Pilzes oxydiert wird, sondern dafs bei längerer Einwirkung auch die Essigsäure zersetzt wird und als einzige Oxydationsprodukte Kohlensäure und Wasser entstehen.

Erst im Jahre 1873 wurde der zweifellose Nachweis erbracht, dafs die beiden Arten der Bildung von Essigsäure aus Alkohol nicht miteinander vergleichbar sind. *von Knieriem* und *Ad. Mager* fanden mehrere Unterschiede. Platinmohr oxydiert sowohl verdünnten als konzentrierten Alkohol, während die Mycoderma höchstens 14prozentigen Alkohol angreifen kann. Die Essigsäuregärung geht am flottesten bei 35° C. vor sich und über 40° C. kann der Organismus nicht mehr arbeiten; Platinmohr wird mit steigender Temperatur immer wirksamer, und die Wirkung kann sich bis zum Glühendwerden des Metalles steigern.

Allmählich fing man an, die Essigsäurebildung als einen biologischen Prozefs zu betrachten, der in allen wesentlichen Punkten der von der Hefe bewirkten alkoholischen Gärung entsprach.

Anfangs glaubte man, die Essigsäurebildung werde nur von einem besonderen Pilz bewirkt, aber spätere Untersuchungen vieler Forscher ergaben das Irrige dieser Annahme. Den Pilz, der am häufigsten angetroffen wird, nannte *Pasteur* Mycoderma aceti, er wurde jedoch später von *Zopf* zu dem Genus Bacterium gerechnet. *Hansen* unterschied zwei Arten dieses Genus, die Alkohol in Essigsäure überzuführen vermochten; er nannte sie Bacterium aceti und Bacterium Pasteurianum. Zwei weitere Arten wurden später von *Brown* unter den Namen B. aceti und B. Xylinum beschrieben. Ersteres scheint im Lichte späterer Untersuchungen nicht mit *Hansens* gleichnamigem Organismus

Digitized by Google

identisch zu sein. *Lafar* hat einen Essigsäure bildenden Organismus isoliert und kultiviert, der zu den Hefen gehört; er fand ihn in saurem Bier.[1])

Bertrand beschrieb einen Spaltpilz, der Sorbit angreift, einen mit dem Mannit isomeren Alkohol; er verwandelt diesen in eine Ketose oder einen Ketonzucker, bekannt als Sorbinose oder Sorbose. Dieser Pilz ist jedoch nicht einwandfrei identifiziert worden.

Im Jahre 1886 führte *Adrian J. Brown* eine sehr eingehende Untersuchung über die Essigsäuregärung des Bacterium aceti durch. Er erhielt den Bacillus in reinem Zustand durch eine Kombination der Fraktionierungsmethode von *Klebs* mit der Verdünnungsmethode von *Nägeli*. So kultiviert, bildet er eine graue, die Oberfläche der Flüssigkeit bedeckende Haut, die in den ersten Stadien die Neigung zeigt, an den feuchten Wänden des Kulturgefäfses hochzukriechen. Bei der Kultur auf Rotwein erlangt die Haut die Dicke von derbem Papier. Durch schwaches Bewegen brach die Haut leicht entzwei; wurde diese vollständig benetzt, so sank sie zu Boden. Bald jedoch bildete sich auf der Oberfläche neues Wachstum. Die Flüssigkeit unter der Haut wurde trübe durch isolierte Zellen des Organismus, und nach einigen Wochen war eine beträchtliche Menge der letzteren zu Boden gegangen. Bei der mikroskopischen Prüfung erwies sich die Haut als aus einer Masse von Zellen bestehend, die etwa 2 μ lang waren, doch sich in dieser Beziehung sehr verschieden verhielten. Die Zellen waren in der Mitte etwas eingeschnürt und sahen etwa so aus wie eine 8. Sie waren miteinander zu Ketten verschiedener Länge verbunden. Manchmal waren die Zellen in der Mitte geteilt und bildeten so Ketten von micrococcusähn-

---

[1]) Gleichfalls aus saurem Bier isolierte *Zeidler* einen Essigsäure bildenden Organismus, den er Termobacterium aceti nannte. Er oxydiert Äthylalkohol, Propylalkohol, Glykol und Dextrose. Günstigste Oxydationstemperatur bei 25° C. Der Essig wird sehr langsam aufgezehrt. Aufser der Essigsäure bildet er noch etwas fixe Säure, jedenfalls Milchsäure. (Centralblatt für Bakteriologie u. Parasitenkunde II. 1896, Nr. 23/24.) W.

Über zwei weitere, bis dahin unbekannte Essigsäure bildenden Bakterien, Bacterium industrium und Bacterium ascendens, berichtet *Henneberg* in der Zeitschrift »Die deutsche Essigindustrie« 1898, Nr. 19 u. s. f. Im Anschlufs an die Beschreibung der beiden neuen Arten giebt der Verfasser noch sehr umfassende Ergänzungen zu den bisherigen Untersuchungen über Essigbakterien.

Digitized by Google

lichen Formen. In der Flüssigkeit unter der Haut wurden längere Zellen gefunden, die oft eine Länge bis zu 10—15 μ erreichten; in einigen Fällen sahen sie aus wie Lepthodrixfäden von gleichmäfsiger Dicke; in anderen waren die langen Zellen an zwei oder drei Stellen aufgeschwollen, wodurch sie ein sehr unregelmäfsiges Aussehen erhielten. Diese Zellen waren im allgemeinen von dunkelgrauer Farbe. An ihren Enden beobachtete man manchmal kleine Stäbchen oder Mikrokokken. Auch sah man oft 3 μ lange kurze Stäbchen und Mikrokokken von 1 μ Durchmesser, die frei in der Kulturflüssigkeit herum schwammen. Die kürzeren Stäbchen und Zellen waren beweglich.

Eine Literflasche halb gefüllt mit einer 5prozentigen sterilen Lösung von Alkohol in Hefenwasser von neutraler Reaktion wurde mit einer Spur der Reinkultur dieses Organismus geimpft und bei 28° C. 10 Tage gehalten. Die Flüssigkeit enthielt alsdann über 1 % Essigsäure und eine sehr kleine Spur einer nichtflüchtigen Säure, die Bernsteinsäure zu sein schien.

Wurde das Bakterium in einer alkoholfreien, 0,75prozentigen Essigsäurelösung bei derselben Temperatur sechs Wochen lang gehalten, so verschwanden zwei Drittel der Säure, die zu Kohlensäure und Wasser oxydiert wurde.

Vergor man eine alkoholische Lösung so weit, dafs aller Alkohol in Essigsäure übergeführt war und setzte die Gärung dann noch weiter fort, so wurde die gebildete Essigsäure noch schneller zersetzt und zwar wiederum zu Kohlensäure und Wasser.

Die Oxydation des Alkohols verlief in zwei Phasen; zuerst bildete sich Aldehyd, der alsdann in Essigsäure verwandelt wurde. Die Reaktion verläuft nach den beiden Gleichungen:

$$2\,CH_3CH_2OH + O_2 = 2\,CH_3COH + 2\,H_2O$$
$$2\,CH_3COH + O_2 = 2\,CH_3COOH.$$

Das Bacterium aceti vermochte auch, wie *Brown* fand, Propylalkohol zu Propionsäure zu oxydieren, jedoch konnte es weder Methyl-, noch Butyl-, noch Amylalkohol zersetzen.

Boutroux fand im Jahre 1880, dafs Bacterium aceti eine Lösung von Dextrose in Glukonsäure verwandelte. Während der Reaktion wurde die Lösung durch einen Zusatz von Kreide neutral erhalten, die die Säure gleich nach ihrer Bildung neutralisierte.

Blondeau beobachtete auch, dafs Zucker von dem Organismus

Digitized by Google

in Säure ohne die Alkoholzwischenstufe verwandelt werden kann. *Brown* bestätigt diese Beobachtung und stellte für die Reaktion folgende Gleichung auf:

$$2\,CH_2OH(CHOH)_4COH + O_2 = 2\,CH_2OH(CHOH)_4COOH$$

Die Oxydation betrifft also die Aldehydgruppe im Zucker, geradeso wie in der zweiten Phase der Oxydation des Äthylalkohols.

Der Organismus vermochte Rohrzucker nicht anzugreifen.

Der Alkohol Mannit, der dem Aldehyd Dextrose entspricht, wurde ebenfalls geprüft. *Brown* kultivierte den Organismus in einer zweiprozentigen Mannitlösung; *Pasteurs* Nährsalz und etwas Gelatine wurden noch weiter als Nährstoff für den Bacillus zugesetzt. Die Kultur wurde sechs Wochen fortgesetzt; nach dieser Zeit war die Flüssigkeit sehr süfs geworden und reduzierte stark *Fehling*sche Lösung. Der Mannit war, wie sich herausstellte, vollständig verschwunden und in Lävulose übergegangen. Der Zucker wurde durch sein Reduktionsvermögen und Drehungsvermögen identifiziert, ferner durch seine Fähigkeit, nach *Dubrunfauts* Prozefs eine krystallisierte Kalkverbindung einzugehen.

Der Organismus zersetzt nicht Laktose, Stärke, Dulcit oder Lävulose; er verwandelt Glykoll in Glykollsäure.

Ein anderer Organismus, der aus Äthylalkohol Essigsäure zu bilden vermag, ist die sogenannte Essigpflanze, die ebenfalls von *Brown* untersucht wurde und von ihm den Namen Bacterium xylinum erhielt. Dieses ist, wie Bacterium aceti, ein aërober Organismus, der auf der Oberfläche der Kulturflüssigkeit wächst und hier eine gelbliche, durchscheinende, manchmal 25 mm dicke Masse bildet. Diese Membran ist etwas schwerer als Wasser und sinkt unter, wenn sie vollständig angefeuchtet ist, wobei oberhalb der alten Schicht ein weiteres Wachstum beginnt. Auf diese Weise bilden sich oft 5—6 Lagen, so dafs die Haut geschichtet erscheint. Bei der Kultur des Organismus in Flüssigkeiten, die seinem freien Wachstum nicht günstig sind, z. B. Hefewasser, tritt er als gelbliche, durchscheinende Masse am Boden der Lösung auf. Diese Masse wächst allmählich, bis die Flüssigkeit zum Schlusse ganz damit erfüllt ist. Bei der Behandlung mit Schwefelsäure und Jod färbt sich die Masse tiefblau, ein Beweis, dafs sie aus Cellulose besteht. Sie scheint aus aufser-

Digitized by Google

ordentlich dünnen Membranen des Organismus aufgebaut zu sein, der auf diese Weise eine Art Zooglöa bildet.

Unter dem Mikroskop erweist sich die Essighaut als aus Bakterien bestehend, die mehr oder weniger in Reihen angeordnet sind und in einer durchscheinenden, strukturlosen Hülle eingebettet liegen. Die Bakterien sind gewöhnlich Stäbchen von 2 μ Länge; mehrere sind oft mit einander verbunden. In alten Kulturen sind die Stäbchen in grofsem Mafse ersetzt durch Mikrokokken von 0,5 μ Durchmesser. Wird der Organismus in einem ungeeigneten Medium kultiviert, z. B. Hefenwasser, so erscheint er in der Form langgedrehter Fäden von 10—30 μ Länge und vom Aussehen der Lepthodrix; er unterscheidet sich jedoch in seinem Aussehen von den ähnlichen Fäden des Bacterium aceti.

Der Organismus wächst am besten bei einer Temperatur von etwa 28° C.; über 36° C. stellt er sein Wachstum ein.

Die durch Bacterium xylinum verursachten Gärungen ähneln denen des Bacterium aceti. Äthylalkohol wird zu Essigsäure oxydiert und diese dann ganz zerstört. Dextrose wird zu Glukonsäure, Mannit zu Lävulose oxydiert. Der Organismus oxydiert nicht Rohrzucker, Stärke und Lävulose. Der grofse Unterschied zwischen beiden Organismen besteht in der durch das Bakterium xylinum bewirkten Bildung grofser Mengen von Cellulose.[1])

Die Salpetersäuregärung.

Der Zerfall der organischen Substanz im Boden, mag sie nun pflanzlichen oder tierischen Ursprunges sein, ist begleitet von der Bildung von Ammoniak oder dessen Verbindungen. Ammoniaksalze, insbesondere schwefelsaures Ammoniak, stehen bei den Landwirten in ständigem Gebrauch als Düngemittel. Die Ammoniaksalze sind jedoch für die grünen Pflanzen nicht so leicht verwertbar, als die salpetersauren Salze. Man weifs schon lange, dafs im Erdboden chemische Veränderungen vor sich gehen,

---

[1]) Eine Einteilung und Charakteristik der Essigsäurebakterien liefert *W. Henneberg* in der »Deutschen Essigindustrie« 1898, Nr. 14 ff.

Siehe auch die umfangreiche Abhandlung von *Hoyer*: Beiträge zur Kenntnis der Essigbakterien. »Die deutsche Essigindustrie« 1899.

Digitized by Google

bei denen es sich in der Hauptsache um die Bildung salpetersaurer Salze handelt.

Die Nitrifikation, wie der Prozefs genannt wird, wurde ehedem als ein rein chemischer Prozefs betrachtet. Wie die Oxydation des Alkohols, so kann auch der Nitrifikationsprozefs mit Platinmohr durchgeführt werden. Erhitzt man Luft und Ammoniakgas vorsichtig in einem Rohr, das Platinmohr enthält, so wird letzteres weifsglühend, und aus dem Gasgemisch bildet sich salpetersaures Ammoniak. Man glaubte, der poröse Erdboden und der in seinen Poren eingeschlossene freie Sauerstoff sei die Ursache der Oxydationsvorgänge im Erdboden; man dachte sich also die Vorgänge ähnlich denen bei der Essigfabrikation.

Im Jahre 1877 veröffentlichten jedoch *Schlösing* und *Müntz* Untersuchungen, aus denen hervorging, dafs der Prozefs ein biologischer und nicht ein rein chemischer ist. Sie fanden, dafs die Nitrifikation auf die Wirkung von Bakterien zurückzuführen sei. Bei niedriger Temperatur, z. B. 5° C., ist der Prozefs kaum wahrnehmbar; mit steigender Temperatur wird er deutlicher und erreicht sein Maximum bei 37°. Über diese Temperatur hinaus wird er allmählich schwächer, und bei 55° C. hört er ganz auf. Sie fanden, dafs vorher auf 100° C. erhitzter Erdboden keinen Nitrifikationsprozefs mehr zeigte.

Giebt man kleine Mengen Erdboden in eine, ein Ammoniaksalz, am besten Chlorammonium, enthaltende Flüssigkeit, so wird letzeres nitrifiziert.

Weitere von manchen späteren Beobachtern angestellte Versuche ergaben, dafs die im Erdboden oder in Lösungen durch Nitrifikation gebildeten Stickstoffverbindungen nicht immer dieselben sind. In einigen Fällen bilden sich salpetrigsaure Salze, in anderen salpetersaure Salze. Eingehende Versuche haben ergeben, dafs der Prozefs in zwei Phasen verläuft; in der ersten wird das Ammoniaksalz zu salpetrigsaurem Salz, in der zweiten Phase wird dieses zu salpetersaurem Salz oxydiert.

Schlösing und *Müntz* führten die Wirkung ursprünglich auf nur einen Organismus zurück, der, wie sie glaubten, das Ammoniaksalz zu Nitrat oxydierte, und sie hielten die gefundenen Nitrite für Reduktionsprodukte der Nitrate. Sie beschrieben den Mikroben als runde oder schwach längliche Körperchen von ver-

Digitized by Google

schiedener Gröfse, stets sehr klein, aber doch am gröfsten, wenn der Organismus in einer an organischen Stoffen sehr reichen Nährlösung gewachsen war; er kommt entweder einzeln oder zu Paaren vor und vermehrt sich durch Teilung.

Die Untersuchungen von *Warrington* und von *Winogradsky* haben unzweideutig ergeben, dafs bei dem Nitrifikationsprozefs zwei verschiedene Mikroorganismen eine Rolle spielen und dafs es jedenfalls von jedem mehr als eine Art giebt.

Einer von diesen Organismen vermag Ammoniaksalze zu salpetrigsauren Verbindungen zu oxydieren. Ist in einer Reinkultur dieses Stadium erreicht, so findet keine weitere Oxydation mehr statt. *Winogradsky* hat zwei Arten dieses Organismus gefunden, Nitrosomonas und Nitrosococcus, von denen der erste merkwürdigerweise in den Böden von Europa, Asien und Afrika, der letztere in denen von Amerika und Australien gefunden wird.

Nitrosomonas besitzt, wenn man den Organismus, wie *Winogradsky*, in einer ammoniakalischen Lösung züchtet, eine länglich-ellipsenförmige Gestalt, die jüngsten Zellen sind jedoch fast rund. Er ist nicht breiter als 1 μ und nicht länger als 1,1—1,8 μ. Am längsten ist er, wenn er sich zu teilen beginnt, er besitzt dann eine hantelförmige Gestalt. Seltener ist der Organismus spindelförmig mit stumpfen Enden. Eine Kette von 3—4 Individuen findet sich sehr selten.

Wird Nitrosomonas in wässeriger Lösung von Ammoniumsulfat unter Zusatz von etwas kohlensaurer Magnesia kultiviert, so kann man drei Wachstumsphasen beobachten. Nach 4 Tagen treten vereinzelte Kolonieen in der Flüssigkeit auf, von denen jede in eine gelatinöse Masse von der Art einer Zooglöa eingeschlossen ist. Nach drei weiteren Tagen wird die Flüssigkeit trübe und enthält alsdann eine freibewegliche, mit Cilien versehene Form. In diesem Stadium sind die Kolonieen auseinandergefallen. Nach weiteren zwei Tagen wird die Flüssigkeit wieder klar und die Mikroben haben eine andere Zooglöa gebildet, die als gelatinöse Masse auf dem Boden des Kulturgefäfses liegt.

Die Nitrococcus-Formen verhalten sich anders. Sie bilden keine Zooglöen, auch besitzen sie keine Wimpern. Sie sind etwas gröfser als die andern, ihr Durchmesser mifst 1,5—2 μ.

Aufser diesen Mikroorganismen, die im ersten Stadium der

Digitized by Google

Nitrifikation ihre Rolle spielen, giebt es andere, denen die Fähigkeit zukommt, die gebildeten Nitrite in Nitrate zu verwandeln und so das begonnene Werk zu vollenden. Es sind dies die kleinsten aller bis jetzt entdeckten lebenden Organismen. Die Zellen sind länglich, oval oder etwas birnenförmig, etwa 0,5 μ lang und 0,15—0,25 μ breit. Diese Art erhielt den Namen Nitrobacter.

Wir verdanken *Winogradsky* unsere hauptsächlichsten Kenntnisse über diesen Mikroben. Er kann in flüssigen Medien kultiviert werden, in denen er dünne schleimige Häute bildet, die den Wandungen des Kulturgefäfses anhaften.

Diese beiden Arten von Organismen kommen gewöhnlich nebeneinander im Erdboden vor, wobei die der zweiten Gattung die aus dem Ammoniaksalz von der ersten Gattung gebildeten Nitrite sofort zu Nitraten oxydieren. Die Nitrobakter-Formen können nicht nur die Ammoniaksalze nicht oxydieren, sondern sie werden auch durch die Anwesenheit von freiem Ammoniak sehr nachteilig beeinflufst. Sonst zeigen die beiden Klassen grofse Ähnlichkeit. Beide wachsen in unorganischen Lösungen und werden in ihrer Wirkung durch saure Karbonate begünstigt. Neutrale oder basische Karbonate hemmen oder unterdrücken ihre Entwickelung, ebenso sind Choralkalium und Chlorcalcium ihrer Wirkung ungünstig. Die Organismen wachsen sämtlich nicht auf Gelatine.

Die Wirkungsbedingungen sind bei allen sehr ähnlich; unter 5° C. wirken sie so gut wie gar nicht; bei etwa 12° beginnt die Nitrifikation merklich und nimmt rasch zu mit der Steigerung der Temperatur auf 37° C. Bei dieser Temperatur wirken sie 10mal so stark als bei 14° C. Über 37° C. nimmt ihre Wirkung schnell ab, und bei 55° C. hört nach *Winogradsky* die Gärung ganz auf. *Warrington* beobachtete schon über 40° C. keine Nitrifikation mehr.

Eine sehr merkwürdige Eigentümlichkeit der Nitrifikationsbakterien ist ihre ausgesprochene Abneigung gegen organische Nahrung. Sie wachsen überhaupt nicht auf Gelatine oder ähnlichen Substanzen; sie scheinen alle organische Materie zu verschmähen. Sie lassen sich leicht kultivieren auf gallertartiger Kieselsäure, die mit den geeigneten Stickstoffverbindungen getränkt ist. Als passende Nährlösung empfiehlt *Winogradsky*

Digitized by Google

für die Nitrosoformen ein Gemisch von 2—2,5 g schwefelsaurem Ammoniak, 2 g Kochsalz und einer genügenden Menge kohlensaurer Magnesia zu einem Liter Brunnenwasser. Letzteres Salz ist nötig zur Neutralisation der Säuren gleich nach ihrer Bildung. Für Nitrobakterien mufs das Ammoniaksalz durch salpetrigsaures Natron ersetzt werden.

In einer solchen Nährflüssigkeit wachsen und vermehren sich die Organismen, am schnellsten und reichlichsten bei Lichtabschlufs. Die Kohlenstoffquelle für die sich entwickelnden Organismen bildet die Kohlensäure, zum Teil die des zugesetzten Karbonates, zum anderen Teil die der Luft. Diese Organismen besitzen demnach das ihnen eigentümlich erscheinende Vermögen, bei Lichtabschlufs Kohlensäure zu zersetzen und deren Kohlenstoff zum Aufbau neuer Zellen zu verwerten. In der That zeigt es sich hier, dafs die Zersetzung der Kohlensäure in diesen Pflanzen ohne Chlorophyll vor sich gehen kann. Die Vorgänge, die sich beim Aufbau dieser Kohlensäure zu durch die lebende Substanz assimilierbaren Verbindungen abspielen, sind noch nicht erforscht. Die für den Prozefs erforderliche Energie scheint durch die Oxydation der stickstoffhaltigen Moleküle beschafft zu werden, so dafs sie von dieser Oxydation abhängig ist. *Winogradsky* hat diese Frage sorgfältig studiert, und er kam zu dem Ergebnis, dafs etwa 35 mg Stickstoff auf jedes Milligramm absorbierter und fixierter Kohlensäure oxydiert wird.

Aufser der Oxydation der Ammoniaksalze läuft noch ein anderer Prozefs im Boden von genau entgegengesetztem Charakter nebenher. Es findet nämlich fortgesetzt ein Denitrifikationsprozefs statt, der durch die zeitweilige Entwickelung von Ammoniak charakterisiert ist, manchmal auch von einer Entbindung freien Stickstoffs begleitet ist. Die Eiweifsstoffe und ihre Abkömmlinge werden von vielen Spaltpilzen und vielen höheren Pilzen zersetzt. Unter diesen sei besonders erwähnt der Bacillus mycoides, der zu beträchtlichen Ammoniakverlusten Veranlassung giebt. Dieser Prozefs hat vieles gemein mit dem Fäulnisprozefs, der später besprochen werden soll. Die Bildung freien Stickstoffs richtet sich danach, ob die Stickstoffquellen Nitrate oder Nitrite sind. Die Bacillus denitrificans α und β von *Gayon* und *Dupetit* sind in dieser Beziehung besonders bemerkenswert. Beide

Digitized by Google

Arten reduzieren Nitrate, α reduziert sie zu Stickoxyd und Stickstoff, β macht nur Stickstoff frei.

Mehrere andere Arten von ähnlichen Eigenschaften sind von anderen Forschern beschrieben worden, darunter auch Bacterium coli commune, das Nitrate zu Nitriten reduziert, wenn es in einer Nährlösung unter Luftabschlufs kultiviert wird. Im Erdboden wächst es häufig symbiotisch mit einem Bacillus, dem Bacillus denitrificans I.; beide zusammen zersetzen die Nitrate unter Bildung von freiem Stickstoff vollständig. *Loew* zeigte, dafs der Reduktionsprozefs bis zur Bildung von Ammoniak gehen kann.

Die Schleimgärung.

In den Weinen, Bierwürzen und einigen natürlichen Pflanzensäften tritt häufig eine sonderbare Erscheinung auf. Die Flüssigkeit wird bei Luftzutritt aufserordentlich schleimig, in einigen Fällen scheint sie geradezu in eine Gallerte verwandelt zu sein.

Diese Erscheinung, die nicht mit der Wirkung der Pektase verwechselt werden darf, ist von mehreren Forschern beobachtet worden; sie hat ihre Ursache in der Wirkung von Mikroben, von denen mehrere isoliert worden sind. Unter den früheren Forschern auf diesem Gebiete mögen erwähnt werden *Braconnot, Gay-Lussac*, *Fremy* und *Pasteur.*

Nach *Pasteur* wird die Schleimgärung durch einen besonderen Organismus veranlafst, der entweder auf Dextrose oder Invertzucker wirkt und diese in eine Art Dextrin oder Gummi verwandelt; gleichzeitig bilden sich Mannit und Kohlensäure. Das Gummi erscheint dem Dextrin ähnlicher als dem arabischen Gummi, da Salpetersäure es zu Oxalsäure und nicht zu Schleimsäure oxydiert.

Héry führte das Dickwerden der Tinte, das man manchmal beobachten kann, ebenfalls auf die Wirkung eines ähnlichen Organismus' zurück.

Ein Gleiches beobachtet man oft bei der Fabrikation des Rohrzuckers, wobei im Rohsaft sich Massen von gelatinöser Beschaffenheit bilden. Sie wurden zuerst von *Cienkowski* im Jahre 1878 untersucht; dieser fand, dafs sie aus Organismen mit aufserordentlich geschwollenen und gelatinisierten Zellwänden bestanden, die

Digitized by Google

als Gallertmassen auftraten, in denen die Organismen eingebettet waren. *Van Tieghem*, der sie ebenfalls studierte und die Lebensgeschichte der Mikroben verfolgte, war der Ansicht, dafs sie in vielen wichtigen Punkten der Alge Nostoc gleichen, mit der Ausnahme, dafs sie nichts von dem für diese Pflanzen so charakteristischen blaugrünen Farbstoff enthalten. Er gab infolgedessen dem Mikroorganismus den Namen Leuconostoc. Weitere Untersuchungen führten *Liesenberg* und *Zopf* im Jahre 1891 aus.

Wie die zuletzt genannten Forscher fanden, bildet der Organismus bei Abwesenheit von Rohrzucker oder Dextrose keine Gallerte; er tritt dann in Kettenform von manchmal beträchtlicher Länge auf; oftmals bestehen die Ketten auch nur aus 2 bis 3 Zellen. Ist aber einer der genannten Zucker zugegen, so bilden sich grofse Zooglöenmassen, in denen die Zellen zu Paaren angeordnet sind. Die Zellen haben stark geschwollene Wände, die schleimige Kapseln bilden, die sich allmählich vereinigen und zur Bildung gelatinöser Massen Veranlassung geben.

Die Gallerte besteht nicht aus unzersetzter Cellulose, sondern aus einem Material, das *Scheibler* ursprünglich Dextran nannte und das wahrscheinlich ein Abkömmung der Cellulose ist.

Der Verfasser fand kürzlich in Gemeinschaft mit *Marshall Ward* einen Organismus, der bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnt wurde und der neben anderen Eigentümlichkeiten auch die Eigenschaft besitzt, bei seiner Züchtung in Zuckerlösungen schleimige Stoffe zu bilden. Nach etwa 3 tägigem Wachstum wurde die Flüssigkeit, in der er kultiviert wurde, aufserordentlich zäh. Die Flüssigkeit enthielt in diesem Stadium zwei Kohlenhydrate, die dem *Scheibler*schen Dextran sehr ähnelten. Sie wurden durch Alkohol ausgefällt und konnten durch nachfolgende Behandlung des Niederschlages mit Wasser getrennt werden, da nur das eine Kohlenhydrat in Wasser löslich ist. Das andere war löslich in verdünntem Alkali; 1 prozentige Natronlauge löste es in der Kälte langsam, schneller beim Kochen. In einer 10-prozentigen Alkalilösung war es leicht löslich.

Der erste dieser beiden Körper besafs in 1 prozentiger Lösung ein spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha]_D = +130$. Mit Jod färbte er sich fleischfarben und reduzierte *Fehling*sche Lösung nicht.

Der andere besafs in 1 prozentiger Lösung kein Drehungs-

Digitized by Google

vermögen. Er wurde von Jod violett gefärbt und besafs, wie der erste, kein Kupferreduktionsvermögen.

Beide Körper gingen bei längerem Kochen mit verdünnter Mineralsäure in Kupfer reduzierende Körper über.

Aus ihren Reaktionen zu schliefsen, gehören sie zur Gruppe der Hemicellulosen, sie liefern jedoch bei der Oxydation mit Salpetersäure keine Oxalsäure.

Andere Organismen rufen in der Milch ähnliche Erscheinungen hervor. Die Milch wird schleimig; die Wirkung der Organismen scheint sich in der Hauptsache auf den Milchzucker zu beschränken.

Wahrscheinlich besteht in den meisten Fällen die zähe Materie lediglich aus den aufserordentlich aufgeschwollenen Zellwänden des Organismus, und es ist daher zweifelhaft, ob diese Erscheinungen sich unter die in diesem Kapitel zu betrachtenden Gärungen einreihen lassen. Ob dabei Enzyme von den Eigenschaften der Cytase oder Pektase ausgeschieden werden, ist noch nicht nachgewiesen, ebensowenig, ob die Veränderungen der Zellwände auf die cytasische oder pektasische Kraft des Protoplasmas zurückzuführen ist.

Es sind jedoch Fälle bekannt, in denen eine ähnliche Bildung schleimiger Massen aufserhalb der Zelle nachgewiesen sind. Im Jahre 1889 beschrieb *Kramer* einen Organismus dieser Art. Es ist dies ein Bacillus, der aus kurzen, mit einander zu Ketten verbundenen Stäbchen besteht. Die Zellwände dieses Bacillus schwellen nicht auf bei der Bildung einer normalen Zooglöa; bei der Kultur in Rohrzuckerlösung bildet sich jedoch in der Kulturflüssigkeit eine eigenartige schleimige Masse, die den Bacillus nicht einzuschliefsen scheint.

Ein anderer Organismus von denselben Eigenschaften wurde von *Glaser* beschrieben. Er nannte ihn Bacterium gelatinosum betae, da er ihn im Safte der roten Rübe fand. Die schleimige Masse, die er bildet, besitzt grofse Ähnlichkeit mit dem Dextrin.

Die Fäulnis.

Die Fäulnis ist ein Prozefs, dem Eiweifs und eiweifsartige Körper unter dem Einflufs verschiedener Mikroorganismen an-

Digitized by Google

heimfallen. Die verschiedenen Zersetzungen beginnen gewöhnlich mit der Bildung von Peptonen. Der Vorgang ähnelt der bereits beschriebenen Magen- und Pankreasverdauung. Die Veränderungen bleiben bei diesem Punkt nicht stehen, auch nehmen sie nicht denselben Verlauf, wie die tryptischen Verdauungsvorgänge; Leucin und Tyrosin werden wahrscheinlich ebenfalls gebildet, gleichzeitig aber treten, offenbar gleichzeitig, noch andere Körper auf. Unter diesen befinden sich Indol, Skatol, Phenol und eine Reihe weiterer, der aromatischen Reihe angehöriger Körper. Aufser diesen verhältnismäfsig einfachen Körpern, deren Zusammensetzung wir kennen, finden sich noch andere mehr komplexer Natur, von denen viele hervorragende Gifte sind. Zu diesen gehören die sogenannten tierischen Alkaloide oder Ptomaïne, von denen eine ganze Anzahl aus faulenden Stoffen isoliert worden sind. Das Eiweifsmolekül wird noch weiter abgebaut; es treten noch auf: höhere Fettsäuren, Ammoniak und seine Verbindungen, verschiedene Amine und Nitrate. Der Schwefel der Eiweifsstoffe geht gewöhnlich in Schwefelwasserstoff über, auch Merkaptan ist in einigen Fällen nachgewiesen worden.

Der Fäulnisprozefs ist begleitet von einem besonderen und charakteristischen Geruch, der hauptsächlich von einigen der bereits erwähnten Körper herrührt, vornehmlich von Schwefelwasserstoff, Ammoniak und anderen dabei entbundenen Gasen. Man kann dies hauptsächlich beobachten, wenn die Bakterien unter Luftabschlufs wirken; bei Luftzutritt ist der Prozefs verhältnismäfsig geruchlos. Thatsächlich ist die Fäulnis im wahren und weitesten Sinne ein anaërober Prozefs.

Bei der Fäulnis sind viele mikroskopische Organismen beteiligt; ihre Wirkungsweise ist bislang bei weitem noch nicht ganz aufgeklärt. Man weifs nicht, ob eine besondere Art der Vorgänge ausschliefslich auf Rechnung eines einzigen Mikroben zu setzen ist, oder ob der Prozefs von einem begonnen und von einem anderen weiter fortgeführt wird, ob die Zersetzungen gleichzeitig oder in einer aufeinanderfolgenden Abstufung sich vollziehen.

Die ältesten Untersuchungen auf diesem Gebiete sind die von *Ehrenberg*, der zuerst im Jahre 1830 das unter dem Namen *Bacterium termo* bekannte Bakterium beobachtete. 11 Jahre

Digitized by Google

später beschrieb es *Dujardin*; es besitzt eine cylindrische Form, ist 2—3 μ lang und 1—1,2 μ dick. Die Zellen kommen oft zu Paaren vereinigt vor, und die so gebildete kurze Kette zeigt eine zitternde Bewegung. *Cohn* zeigte im Jahre 1892, dafs die Fäulnis ein besonderer durch dieses Bakterium zuwege gebrachter Prozefs sei.

Im nächsten Jahrzehnt war das Bacterium termo der Gegenstand der Untersuchung zahlreicher Forscher. Die verbesserten Untersuchungsmethoden liefsen bald erkennen, dafs unter einem Namen verschiedene Formen vereinigt waren; im Jahre 1884 beschrieb *Rosenbach* drei bestimmte Arten unter dem Namen *Bacillus saprogenes* I, II und III. Ein Jahr darauf beschrieb *Hauser* drei Arten von Spaltpilzen, die bei der Fäulnis beteiligt sind und die er einem neuen Genus, *Proteus*, zuteilte. Diese sind ganz aufserordentlich beweglich und mit einer wechselnden Anzahl von Wimpern versehen. *Proteus vulgaris* findet sich oft in Form länglicher Stäbchen, 3—6 μ lang und durchschnittlich 0,9 μ breit. Alle diese Formen sind jedoch sehr vielgestaltig.

Escherich beschrieb einen anderen Mikroben unter dem Namen *Bacterium coli commune*, der stets im Eingeweide der Säugetiere vorkommt und in grofser Menge in den entleerten Fäces gefunden werden kann. Es ist ein kurzes Stäbchen, 0,5 bis 2 und 3 μ lang und durchschnittlich 0,4 μ breit.

Mehrere andere Arten, die noch nicht so bestimmt erkannt sind, wurden von anderen Forschern beschrieben. Sie alle sind sehr vielgestaltig; die Form, die sie annehmen, hängt sehr von den Kultur- und Ernährungsbedingungen ab. Es ist daher sehr schwierig, die Grenzen einer bestimmten Art genau festzulegen.

Der durchaus nicht einfach geartete Verdauungsprozefs in den Eingeweiden der Säugetiere steht mit der Gegenwart vieler dieser Bakterienformen im Zusammenhang. Wir wir sahen, besteht die Einwirkung des Pankreassaftes in der Umwandlung der Eiweifsstoffe in Leucin und Tyrosin. Das Auftreten von Indol, Skatol und anderen übelriechenden Produkten im Dick- und zum Teil im Dünndarm findet zweifellos seine Erklärung in dem Zusammenwirken dieser Mikroben mit dem Trypsin des Pankreassaftes und in der Wirkung der Bakterien nach Beendigung der

Digitized by Google

enzymatischen Wirkung. Dafs in dem Teile des Dünndarms, der Galle enthält, diese Mikroben nicht gefunden werden, ist auf die antiseptische Wirkung der Galle zurückzuführen.

Obwohl zweifellos in den meisten Fällen das Protoplasma der Mikroben direkt die Gärung oder Fäulnis bewirkt, so darf doch nicht vergessen werden, dafs viele dieser Organismen Enzyme ausscheiden, die die verschiedenartigsten Zersetzungen bewirken. Die Beobachtungen von *Lauder Brunton* und *MacFayden*, ferner die von *Wood* sind bereits in einem früheren Kapitel mitgeteilt worden; wir erfuhren da, dafs z. B. verschiedene Mikroben Trypsin ausscheiden. *Hankin*, *Martin* und andere fanden, dafs der *Bacillus anthracis* giftige Albumosen bildet, und *Hankin* konnte aus diesem Mikroben ein Enzym gewinnen, das aus Fibrin Albumose zu bilden vermochte. *Courmont* und *Doyon* stellten aus dem Starrkrampf-Bacillus ein Enzym dar, das wieder andere Zersetzungen bewirkt; es bildet eine dem Strychnin ähnliche giftige Substanz. Dieses Enzym, das bislang noch keinen Namen erhalten hat, wird beim Erwärmen auf 65° C. zerstört. Seine Entdecker führen die eigentümlichen Symptome beim Tetanus (Starrkrampf) auf die Wirkung dieses Enzyms zurück und behaupten, dafs die Immunität gegen Starrkrampf in der Wirkung von Stoffen zu suchen sei, die die Wirksamkeit des Enzyms verhinderten. Es selbst ist nicht giftig, es bereitet jedoch die Alkoloidsubstanz im Körper; der giftige Stoff kann aus Starrkrampfmuskeln und aus dem Blute und dem Urin eines mit Starrkrampf vergifteten Tieres gewonnen werden.

Unter den giftigen Produkten der Fäulnis finden sich nicht nur Albumosen, sondern auch eine Reihe anderer Eiweifsabkömmlinge, denen *Selmi* im Jahre 1878 den Namen Ptomaïne beilegte. Auf diesem Gebiete haben viele Forscher gearbeitet, unter denen in erster Reihe *Panum*, *Nencki* und *Brieger* genannt seien.

Die meisten der bislang bekannten Ptomaïne entdeckte der letztgenannte Forscher, dessen Bemühungen wir neue Methoden zur Darstellung dieser Substanzen aus faulenden Flüssigkeiten verdanken. *Brieger* isolierte Cholin, Putrescin, Neuridin und Cadaverin. Aus dem erstgenannten Ptomaïn kann man Muscarin erhalten, das Gift des roten Fliegenschwammes.

Digitized by Google

Einige dieser giftigen Körper kommen in alten, von gewissen Mikroben befallenen Käsen vor.

Andere, den Ptomaïnen ähnliche, wenn nicht mit diesen identische Körper bilden sich im Körper und in fauligen Flüssigkeiten, vorausgesetzt, dafs die zu ihrer Bildung nötigen Mikroben vorhanden sind. Man nennt diese Produkte Leucomaïne.

Die Ptomaïne und ähnliche Körper gehören wahrscheinlich der Pyridingruppe der aromatischen Reihe an.

Wie man sieht, tritt die Fermentativkraft des Protoplasmas immer und immer wieder zu Tage und ist von den verschiedenartigsten Zersetzungsvorgängen begleitet, von denen manche verhältnismäfsig einfacher, andere wieder sehr verwickelter Natur sind. Die lebende Substanz kann die einzelliger oder vielzelliger Organismen sein, die der Mikroben von fast unmefsbarer Kleinheit oder von Pflanzen von allergröfstem Umfange — die Verschiedenheit der Pflanzen berührt wohl das lokale Vorkommen, aber nicht den Charakter des aktiven Protoplasmas. Gewisse Erscheinungen, die man bei der Bethätigung dieser Eigenschaft durch einzellige Mikroben beobachtete, führten zu der lange Zeit geltenden Ansicht, dafs diese besondere „Fermente“ seien und in erster Linie ihnen als Klasse zukommende Eigenschaften besäfsen. Unter diesen Erscheinungen fiel besonders die eine auf, dafs die Veränderungen, die sie bewirken, zu ihren biologischen Bedürfnissen in gar keinem Verhältnis stehen und demgemäfs einer ganz besonderen Erklärung bedurften. Besonders in die Augen springend war der Umfang der von ihnen bewirkten Reaktionen, gegen die der Stoffwechselprozefs, der diese Reaktionen zu Wege brachte, in den Hintergrund trat.

Die gleichen Thatsachen stofsen uns auch heute noch auf, und auch heute noch können wir sie nur versuchsweise erklären. Beim Vergleich dieser niederen Formen mit den höheren Pflanzen sehen wir jedoch, dafs wir die Wirksamkeit der ersteren mit der der Zellen vieler Gewebe der letzteren in Parallele stellen können, dafs die von beiden bewirkten Zersetzungen denselben Charakter besitzen, und dafs in einigen Fällen bei beiden die Umwandlungsprozesse durch ausgeschiedene Enzyme bewirkt werden.

Digitized by Google

Die Zersetzungen dieser sogenannten „organisierten Fermente“ sind demnach nur in zweifacher Beziehung eigenartig: 1. der grofse und tiefgehende Umfang, in dem sie sich abspielen; 2. der weniger einfache Charakter der von manchen derselben gebildeten Produkte. Letzteres braucht jedoch noch nicht als erwiesen zu gelten; es ist nicht ausgeschlossen, dafs z. B. die komplexen Produkte der Fäulnis das Ergebnis der Wirkung mehrerer nach einander wirkender Mikroben sind. In diesem Falle besagt der zweite Punkt nur, dafs das Protoplasma verschiedener Organismen ganz verschiedene Fähigkeiten besitzt, sehr verschiedene Zersetzungen zu bewirken. Und selbst diese Anschauung ist unvollkommen, denn die Zahl der bekannten Enzyme wächst jeden Tag und kann möglicherweise schliefslich der Zahl der Zersetzungsvorgänge entsprechen, die wir jetzt der Thätigkeit der lebenden Substanz zuschreiben.

Die Mikroben weisen noch andere Eigentümlichkeiten auf, die ihre Zugehörigkeit zu den „organisierten Fermenten“ rechtfertigen mögen. Man wies besonders darauf hin, dafs die „organisierten Fermente“ von den „unorganisierten Fermenten“ (Enzymen) völlig verschieden seien. In dieser Richtung wirkten besonders *Nägeli* und *Sachs*, und hier mag darauf Bezug genommen werden, um zu zeigen, wie gänzlich unhaltbar diese alte Anschauung ist, wie thatsächlich zwei Dinge mit einander in Vergleich gestellt wurden, die so grundverschieden von einander sind, dafs jeder Vergleich unmöglich ist, wodurch aber der wahre Zusammenhang zwischen beiden völlig verschleiert wurde.

Sachs fafst zunächst diese Eigentümlichkeiten in folgenden Sätzen zusammen: „Ich finde mit *Nägeli* einen ganz besonders in die Augen fallenden Unterschied in der Thatsache, dafs (abgesehen von den Spaltungsenzymen wie Myrosin und Emulsin) die plastischen Substanzen durch die Wirkung der unorganisierten Fermente aus dem passiven in den aktiven Zustand übergeführt werden. Die Gärung durch Pilze hat, wie *Nägeli* behauptet, ganz den entgegengesetzten Charakter; ihre Produkte sind ausnahmslos keine Nährsubstanzen, im Gegenteil zerstört die Gärung gerade die hauptsächlichsten Nährstoffe.“

Nägeli sagt: „Der Gegensatz erscheint am schlagendsten im Falle der Kohlenhydrate und Eiweifsstoffe. Während die unorgani-

Digitized by Google

sierten Fermente daraus Glukosen und Peptone bilden, so zerlegt die Gärung durch Pilze diese Verbindungen in Alkohol, Mannit, Milchsäure und in Leucin, Tyrosin u. s. w., und in einigen Fällen folgen mehrere Gärungen aufeinander; die Gärprodukte werden schrittweise für die Ernährung ungeeigneter. Im allgemeinen können wir sagen, dafs die Hefenpilze das Medium, in dem sie wirken, durch jeden Gärungsvorgang, den sie hervorrufen, für die Ernährung ungeeigneter machen."

Im Lichte der im Laufe der letzten Jahre erlangten Kenntnisse, können diese Thatsachen nicht länger als ausgeprägte Unterschiede zwischen Mikrobengärung und Enzymwirkung gelten. Die erste Kritik von *Sachs* verliert gerade durch die von ihm erwähnten Ausnahmen ein gutes Teil ihrer Beweiskraft. Es liegt gar kein Grund vor, Emulsin und Myrosin als Ausnahmen zu behandeln. Wir sahen, dafs die Bedingungen, unter denen sie wirken, dieselben sind, denen auch die Wirkung der Diastase und des Pepsins unterliegt. Die Wirkung ist, soweit wir zu beurteilen vermögen, ähnlich in der Art; beide, Diastase und Emulsin, bewirken Hydrolyse und darauf folgende Zersetzung der Körper, die sie angreifen. Die Eigentümlichkeit, weniger geeignete Nährstoffe zu bilden, kommt den Pilzen nicht allein zu; die Enzymwirkung hat oft ähnliche Zersetzungen zur Folge. Die Urease bildet kohlensaures Ammoniak aus dem Harnstoff; das von *Hammarsten* entdeckte Milchsäure-Enzym bewirkt dieselbe Veränderung wie der Milchsäure-Bacillus. *Buchners* Zymase bildet Alkohol aus Zucker. Auf der anderen Seite hinwiederum verwandeln gewisse Mikroben Stärke in Zucker, während andere Eiweifs peptonisieren.

Die von *Nägeli* aufgestellten Gegensätze sind also gar nicht vorhanden. Wir haben gesehen, dafs die Verzuckerung der Stärke und die Peptonisation des Eiweifses von Gliedern der beiden Klassen bewirkt werden können.

Die Umwandlung der Eiweifsstoffe in Leucin, Tyrosin, Asparagin ist keine bestimmte Eigenschaft der Pilze; sowohl das tierische als auch das pflanzliche Tyrosin vermögen dasselbe.

Beide oben genannten Botaniker legen Wert auf die Bildung von Nährstoffen aus plastischen Stoffen durch die Enzyme. Die Wirkung der letzteren ist aber keineswegs auf die Bildung solcher Stoffe beschränkt. Es seien hier die kürzlich entdeckten Oxy-

Digitized by Google

dasen erwähnt, die mit dem Ernährungsprozefs gar nichts zu thun haben. Ebenso wenig bilden die Enzyme Thrombase und Pektase für die Organismen, in denen sie vorkommen, Nährstoffe.

Sachs sagt weiter: „*Nägeli* begründet seine Ansicht, dafs die Gärung durch Organismen von der durch unorganisierte Fermente bewirkten verschieden sei, noch wie folgt: —, die Gärung ist also die Übertragung der Bewegungen der Moleküle, Atomgruppen und Atome verschiedener, das lebende Plasma bildender Verbindungen, die bei dem Prozefs chemisch unverändert bleiben, auf die gärfähige Substanz, wodurch das Gleichgewicht ihrer Moleküle gestört und sie zersetzt wird.“ *Fischer* und andere Forscher haben gezeigt, dafs diese Auffassung, die *Nägelis* Theorie der Gärung darstellt, wenn sie überhaupt zutrifft, ebenso für die Enzyme zutrifft. Über diesen Punkt wollen wir jedoch lieber in einem späteren Kapitel diskutieren.

Bei der Betrachtung der vom Protoplasma der höheren Pflanze in die Wege geleiteten Fermentativprozesse finden wir, dafs diese in Bezug auf die gebildeten Zersetzungsprodukte dieselbe Mannigfaltigkeit aufweisen wie die der Mikroben. *Böhm* und *de Luca* zeigten, dafs lebende Pflanzenteile, die ungenügend mit Sauerstoff versorgt werden, Wasserstoff und manchmal Sumpfgas entwickeln. *Boussingault* und *Schulz* haben ähnliche Beobachtungen gemacht. Wasserstoff entwickeln auch Mannit enthaltende Pflanzen, während aus der Apfelsäure in den Früchten, Blüten und Blättern des Hartriegels Essigsäure entsteht. Bei der Zersetzung des Eiweifses fand *Böhm* Ammoniak. Die Bedingung, unter der diese Vorgänge sich abspielen, nämlich Mangel an Sauerstoff, ist der Normalzustand vieler Mikroben, die anaërob sind. Bei Gegenwart von Sauerstoff finden wir die gleiche Übereinstimmung. Die Inversion des Rohrzuckers ist der gleiche Vorgang, mag er nun durch eine lebende Zelle des Blattes oder durch die Invertase der Hefe oder einer höheren Pflanze bewirkt werden.

Sachs betrachtet es als eine Eigentümlichkeit einer jeden von Pilzen bewirkten Gärung, dafs dabei Kohlensäure als Nebenprodukt auftritt. Das ist jedoch, wie wir gesehen haben, eher die Wirkung des Sauerstoffmangels, und das Gleiche kann unter denselben Bedingungen bei der fermentativen Wirkung des Protoplasmas der höheren Pflanzen beobachtet werden. Es herrschen

Digitized by Google

also, wie wir sehen, in den höheren und niederen Pflanzen im wesentlichen die gleichen Zustände; der Unterschied zwischen beiden liegt lediglich in der Differentiation und darauffolgender Teilung der Arbeit. Bei den niederen Formen haben die stark hervortretenden metabolischen Vorgänge alle ihre anderen Funktionen überschattet, und man hat sie daher mit besonderen Eigenschaften ausgestattet. Bei den höheren Pflanzen können ganz ähnliche Zersetzungen zu Wege gebracht werden, aber nicht durch die ganze Pflanze, sondern durch gewisse Zellen oder Teile derselben. Das Agens der Zersetzung ist das gleiche: Protoplasma; die Bedingungen sind ähnliche, und die gebildeten Produkte sind streng vergleichbar. Die Ausscheidung eines Enzyms, wozu sowohl die niederen als auch die höher organisierten Pflanzen imstande sind, ist ein Zeichen der Differentiation innerhalb der lebenden Substanz, ebenso wie wir in den langsamen Bewegungen des amöboiden Protoplasmas die Kontraktion des Muskelfasers im höheren und ausgebildeteren Organismus wieder erkennen.

Auf eine Thatsache, die auf den ersten Blick uns zu berechtigen scheint, die Mikroben in eine besondere Klasse fermentierender Organismen einzureihen, ist schon zu verschiedenen Malen hingewiesen worden. Das ist die Thatsache, dafs manche von ihnen mehr als eine Art der Zersetzung zu bewirken vermögen. *Lauder Brunton, Wood* und andere Forscher zeigten, dafs derselbe Bacillus Stärke zu verzuckern und Eiweifs zu peptonisieren vermag; andere bringen aufserdem noch die Milch zur Gerinnung. Bacillus mesentericus vulgatus besitzt, wie wir gesehen haben, diastatische, cytatische, invertatische, peptatische Kraft und bringt die Milch zum Gerinnen.

In einem solchen Falle ist es wichtig, die biologischen Eigentümlichkeiten der Organismen zu erforschen. Sie üben diese Kräfte je nach dem Medium aus, in dem sie gezüchtet werden; viele wirken durch Abscheidung von Enzymen, und deren Bildung hängt von dem Anreiz, den die Kulturflüssigkeit ausübt, ab. *Vignal,* der den zuletzt genannten Bacillus untersuchte, fand, dafs die Eigenschaften der verschiedenen Enzyme, die er bildet, in der Hauptsache abhängig sind von der Natur der Flüssigkeit, in der er sich gerade befindet. Die Fermentation ist also in diesen Fällen dem Metabolismus streng untergeordnet.

Digitized by Google

Hier erinnert man sich der Beobachtungen von *Schiff* und anderen, die fanden, dafs der Ausscheidung des Magenpepsins die Aufnahme stickstoffhaltiger Nahrung voraufgehen müsse. Es erinnert auch an das Verhalten einer Amöbe, die eine Nährvakuole mit ihrer Verdauungsflüssigkeit nur um einen verdaulichen Nahrungspartikel bildet. Ein unverdaulicher Fremdkörper wird nicht in eine derartige Vakuole eingeschlossen.

Digitized by Google

Kapitel XXII.

Die Ausscheidung der Enzyme.

Bei der Besprechung verschiedener Enzyme, insbesondere der in verschiedenen Drüsen gebildeten, sahen wir, dafs zur Sekretion der Enzyme ein gewisser Anreiz gehört. So kann z. B. ein vermehrter Speichelflufs durch Reizung des Reflexnerven veranlafst werden, wenn z. B. ein entsprechender Nerv durch Auflegen einer schmackhaften Substanz auf die Zunge gereizt wird, oder wenn ein appetitlicher Duft die Geruchsmembran der Nase trifft. Der Nahrungsaufnahme folgt ein Ergufs von Magen- und Pankreassaft.

Aufser einer wirklichen Nervenbeeinflussung besitzt die Nahrungsaufnahme an sich einen mächtigen Einflufs auf die Bildung und Ausscheidung der Enzyme. Es ist diese Thatsache von vielen Forschern festgestellt worden, unter denen besonders *Heidenhain* erwähnt sein möge, dessen Versuche über die Ausscheidung des Magensaftes in einem nach *Thirys* Methode isolierten Magenteil entschieden darauf hindeuten, dafs die Nahrungsaufnahme eine entschiedene Vermehrung der ausgeschiedenen Enzyme durch die Schleimhaut des Organs zur Folge hat. *Schiff* wies ebenfalls darauf hin, dafs die Aufnahme von Nährstoffen die Enzymausscheidung vermehre.

Diese Art des Anreizes ist auch bei verschiedenen pflanzlichen Lebewesen beobachtet worden. Die Bildung der Diastase in den Pollenkörnern von Zamia ist, wie der Verfasser nachwies, direkt abhängig von der Zuckeraufnahme.

Auch die bereits erwähnten Beobachtungen von *Lauder Brunton* und *MacFayden* über die Enzymausscheidung der von ihnen geprüften Bakterien liefern denselben Beweis. Sie fanden, dafs die Art des Mediums, in dem die Organismen kultiviert

Digitized by Google

wurden, entscheidend dafür war, ob Diastase oder Trypsin gebildet wurde. Die Aufnahme eines Kohlenhydrates in einem Falle, die eines Eiweifsstoffes im andern Falle ging der Bildung des Enzyms vorauf.

In einigen Fällen ist jedoch der Anreiz ein anderer. *Brown* und *Morris* zeigten bei ihren Untersuchungen über die Sekretion der Diastase durch das Schildchen des Gerstenembryos, dafs in dessen Zellen kein Enzym gebildet wird, solange der Embryo künstlich mit Zuckernährstoff versorgt wird und infolgedessen es nicht nötig hat, sich aus der Stärke des Endosperms selbst seine Nahrung zu schaffen. *Wortmann* zeigte, dafs gewisse Mikroben Diastase bilden, wenn Stärke die einzige ihnen zur Verfügung stehende Nahrung ist, dies jedoch nicht thun, wenn ihnen gleichzeitig mit der Stärke Zucker geboten wird. *De Bary* beobachtete eine ähnliche Erscheinung beim Bacillus amylobacter, der keine Cytase bildet, solange er Dextrose zur Verfügung hat. Wird die Zuckerzufuhr eingestellt, dann greift er Cellulose an und scheidet zu diesem Behufe Cytase aus. *Pfeffer* konstatierte dasselbe bei der Kultur dreier Organismen, Penicilium glaucum, Aspergillus niger und Bacterium megatherium. Die Bildung der Diastase wurde bei allen dreien eingeschränkt, sobald der Zuckergehalt der Kulturflüssigkeit wuchs, wenn auch der Aspergillus in dieser Beziehung weniger empfindlich war als die andern.

In mehreren Fällen scheint die Sekretion des Enzyms durch Nahrungsentziehung veranlafst zu werden, so dafs der Organismus sich im Stadium der beginnenden Verhungerung befindet.

Der Ausscheidungsvorgang und die Wirkung der Anreize auf diesen kann nur bei wohl differentiierten Drüsen studiert werden. Auch hier ist dies nicht immer möglich; es geschieht dies am besten in den Fällen, wo die Sekretion nur zeitweise, aber, wenn einmal begonnen, recht kräftig von statten geht.

Aus manchen Gründen eignen sich die Pankreaszellen am besten zum Studium des Ausscheidungsprozesses. Zwar scheidet dieses Organ mehrere Enzyme aus, und, soweit wir wissen, werden diese alle in denselben Zellen gebildet. Ihre Bildung ist jedoch ein einfacher Prozefs.

Heidenhain studierte das Verhalten der Pankreaszellen unter

Digitized by Google

verschiedenen Ernährungsbedingungen. Bei einem Hunde, der über einen Tag gefastet hatte, bestand jede Zelle aus zwei Zonen; eine grenzte an das Lumen der Alveole an, die andere befand sich am Ende der Zelle gegen die Grundmembran hin. Die innere war die bei weitem geräumigste und war mit feinen Körnchen erfüllt. Die äufsere war eng und von homogener Substanz. Der Zellkern war geschrumpft und runzelig; er befand sich an der Grenze der beiden Zonen. Im Pankreas eines anderen Hundes, der während der vollen Verdauung getötet wurde, waren die beiden Zonen deutlich sichtbar, doch war die homogene äufsere weiter und die innere gekörnte war zusammengezogen, die Körnchen waren viel weniger zahlreich. Die ganze Zelle war kleiner geworden, während der Zellkern eine runde Gestalt angenommen hatte und fast central gelagert war. Ein dritter Pankreas, der nach Schlufs der Verdauung entnommen worden war, zeigte die äufsere Zone wieder verkleinert und die innere wieder entschieden reicher an Körnchen.

Es ergab sich, dafs die Körnung wahrscheinlich mit der Gegenwart des Enzyms im Zusammenhang steht, das wahrscheinlich während der Ruheperiode gebildet und während der Verdauungsthätigkeit abgesondert wird. Die Änderung der Gröfse der Zelle, die mit dem Ergufs des Pankreassaftes Hand in Hand ging, bewies, dafs mit dem letzteren eine beträchtliche Menge löslicher Substanz, die in der Zelle enthalten war, dieser entzogen wurde.

Die Bildung der Körnchen fiel zeitlich zusammen mit einer Vergröfserung der Zelle und deutete auf einen Verbrauch von Nährmaterial auf Kosten ihrer eigenen Substanz hin.

Kühne und *Lea* beobachteten den Ausscheidungs-Vorgang im lebenden Kaninchen und stellten ungefähr dasselbe fest wie *Heidenhain*; auch sie brachten die Bildung des Enzyms mit der Körnchenbildung und ihr Verschwinden mit dem Ergufs der Sekretion in Verbindung.

Bei den Speicheldrüsen können wir ähnliches beobachten. In den Zungenschleimdrüsen des Frosches kann man eine äufsere Region beobachten, in der das Protoplasma klar ist, und eine viel gröfsere innere Region, die mit Körnchen erfüllt ist. In einer serösen Drüse erschien im Zustand der Ruhe die ganze Zelle körnig, es fand sich keine äufsere Zone. Wurde der sekre-

Digitized by Google

torische Nerv gereizt, so erfolgte ein Ausflufs der Sekretion und gleichzeitig eine Verminderung der Körnung. In der Schleimdrüse verschwinden die Körnchen fast alle, in der serösen Drüse werden sie aus dem äufseren Teil der Zelle entfernt, der homogen wird. Sind die Körnchen alle entfernt, so schrinkt die ganze Alveole zusammen, und die Umrisse der sie einschliefsenden Zelle werden deutlicher.

Dieselben Vorgänge kann man in den Hauptzellen der Magendrüsen beobachten, die Pepsin ausscheiden. In den verschiedenen Teilen des Magens eines Säugetieres kann ein noch deutlicherer Zusammenhang zwischen den Körnchen und dem Enzym festgestellt werden; insbesondere zeigt diese Beziehungen besonders deutlich das Kaninchen. Im Magengrund sind die Hauptzellen sehr grobkörnig, die Röhrendrüse sieht fast aus wie eine Masse von Körnchen. Gegen die grofse Krümmung hin wird das mehr und mehr anders; in der Mitte dieser Region besitzen die Zellen einen äufseren homogenen Rand; noch weiter nach der Pförtnergegend hin enthalten die Zellen immer kleiner werdende Körnchen und die Pförtnerdrüsen selbst sind ungekörnt. Die Anordnung entspricht genau dem Vorkommen des Pepsins in der Schleimhaut.

Die Regelmäfsigkeit mit der die Zellen verschwinden, beginnend am äufseren Rand der Zelle und nach innen zum Lumen hin fortschreitend, ist hauptsächlich charakteristisch für die Drüsen der Säugetiere. Bei den niederen Wirbeltieren, einschliefslich der Vögel, Schlangen und Frösche, kann man eine äufsere nicht gekörnte Zone nicht immer beobachten, dafür aber eine Veränderung der Körner in Zahl und Gröfse durch die ganze Zelle hindurch.

Die Neubildung der Körnchen vollzieht sich mit grofser Schnelligkeit. Der Prozefs scheint zu beginnen, ehe die Zelle gänzlich leer ist, und während des letzten Teils der Verdauungsperiode anzudauern, so dafs bei Beendigung dieses Prozesses die Zellen wieder ihr ursprüngliches gekörntes Aussehen haben.

In einigen Fällen, besonders in den Pförtnerdrüsen des Magens, erscheint die Sekretion nicht in Körnchenform, sondern wird in den Maschen des Protoplasmas als homogene Masse abgelagert.

Digitized by Google

Beim Vergleich dieser, bei allen Drüsen in der Hauptsache gleichen Vorgänge ergiebt sich, dafs der Ausscheidungsprozefs aus einer Reihe aufeinanderfolgender Prozesse besteht. Gehen wir von einer gänzlich entleerten Zelle aus, so wächst diese auf Kosten von aufsen her aufgenommener Nahrung; unmittelbar darauf erfolgt die Bildung der groben Körnchen, die im Ruhezustand der Drüse die Zellen ausfüllen, und schliefslich zu Beginn des Enzymergusses vollzieht sich ihre Lösung und Ausscheidung in die von der Drüse ausgeschiedene Flüssigkeit.

In einigen Zellen verlaufen diese Prozesse so allmählich, dafs man sie in ihrer Aufeinanderfolge beobachten kann. Es ist möglich, dafs alle Vorgänge sich gleichzeitig abspielen, doch nehmen sie einen ungleichmäfsigen Verlauf. Bei anderen verlaufen sie gleichzeitig und gleichartig, dafs die Aufeinanderfolge der Erscheinungen verwischt wird.

Bei den pflanzlichen Sekretionen ist es noch schwieriger, die Aufeinanderfolge der Vorgänge zu beobachten, da hier die Ausscheidungen sehr lange währen und wahrscheinlich kaum abwechselnd verlaufen. Verschiedene Forscher haben sie in einigen Fällen beobachtet, doch wissen wir bei weitem nicht so viel darüber, wie über die Vorgänge in den tierischen Zellen. Der Unterschied hängt hauptsächlich vom Charakter des Stoffwechsels der Pflanze im Vergleich zu der des Tieres ab. Bei letzterem setzt der Verdauungsprozefs zeitweise aus und wiederholt sich fortwährend; bei ersterem ist der entsprechende Prozefs, die Nutzbarmachung der Reservestoffe in den Samen, Knollen etc. ein kontinuierlicher und sehr allmählicher.

Die Beobachtungen von *Brown* und *Morris* über die Veränderungen im Schildchen-Epithel des Gerstenkornes sind die vollständigsten, die bislang vorliegen.

Das Epithelium, das das Schildchen des Gerstenembryos bedeckt, besteht aus säulenförmigen Zellen, die ungefähr 0,03 bis 0,04 mm lang und 0,01 mm breit sind. Ihre Längsachsen stehen senkrecht zur Oberfläche. Die Zellwände sind sehr dünn und nicht verkorkt. Der Zellinhalt ist vor Beginn der Keimung sehr feinkörnig, und der Zellkern, der grofs und in Gestalt elliptisch ist, liegt am Grunde der Zelle, und zwar mit seiner Längsachse quer. Einige Stunden nach der Keimung werden die sehr feinen

Digitized by Google

Körnchen gröfser und gröber und so zahlreich, dafs der Zellkern, der zuerst sehr deutlich zu sehen war, so verdeckt wird, dafs er kaum noch zu sehen ist. Dieser Prozefs ist in etwa einem Tage zu Ende; die Körnung dauert an, bis das Endosperm fast sein ganzes Reservematerial verloren hat. Jetzt fällt das Epithel in seiner Funktion als Sekretionsgewebe sehr ab; das Protoplasma wird wieder klar und durchscheinend. Nur einige Körnchen bleiben übrig, sehr klein und sehr stark lichtbrechend, und besitzen nur noch wenig Ähnlichkeit mit der während der Sekretion vorhandenen groben Körnung. Bemerkenswert ist aufserdem noch, dafs der Zellkern ganz verschwunden ist.

Die andauernde Sekretion steht mit der reichlichen Nahrungszufuhr zur Zelle im Zusammenhang. Diese kommt von den Reservestoffen des Endosperms, teils von den Kohlenhydraten, auf die die Enzyme einwirken, teils von den Reserveeiweifsstoffen aus dem Aleuronlager.

Man darf die allgemeine Ähnlichkeit der Erscheinungen bei diesem längere Zeit andauernden und dem für die Pankreaszellen von Zeit zu Zeit aussetzenden Prozefs nicht unterschätzen.

Gardiner hat den Sekretionsprozefs in den auf den Blättern von Dionea liegenden Drüsen studiert. Wenn das Blatt dieser Pflanze durch Berührung seiner Oberfläche mit Nährstoffen gereizt wird, faltet es sich und schliefst den den Reiz verursachenden Körper ein; die Drüsen entlassen eine Verdauungsflüssigkeit, die ein proteolytisches Enzym enthält. Der Ausscheidungsprozefs vollzieht sich hier schneller wie beim Gerstenkeimling und wird von derselben Drüse mehr wie einmal wiederholt.

Gardiner unterscheidet vier Perioden des Sekretionsaktes: 1. eine, die der Sekretion voraufgeht, wenn die Zellen sich im Ruhezustand befinden; 2. eine Periode, während der das Enzym gebildet und aus der Drüse ausgestofsen wird; 3. eine Periode, während der die Aufnahme der Nahrung vor sich geht; 4. eine Periode der Erholung. In der ersten Periode bedeckt eine Protoplasmalage die Zellwand und umgiebt eine grofse centrale, mit Zellsaft gefüllte Vakuole. Das Protoplasma ist sehr körnig, besonders um den Zellkern herum, der am Grund der Zelle liegt; vielfach wird er von den Körnchen gänzlich verdunkelt. Am Ende der zweiten Periode hat sich der Zellkern nach der Mitte

Digitized by Google

der Zelle zu bewegt und ist von einer Plasmalage umgeben, die durch Zügel mit der Wandhaut verbunden ist. Das Protoplasma hat seine Körnung verloren und ist klar und hyalin geworden. Der Zellkern selbst ist viel kleiner als zuvor.

Gardiner beobachtete auch bei den Drüsenzellen der Fühlfäden (Tentakeln) von Drosera, daſs im Ruhezustand der Drüsen das Protoplasma viel körniger war, als es nach einer Periode der Thätigkeit oder Sekretion wurde. Ähnliche Ergebnisse erhielt auch Fräulein *Huie.*

Die Sekretion der Rhamnase von der Nuht des Samens von Rhamnus infectorius ist, wie *Marshal Ward* feststellte, von der Bildung von Körnchen begleitet. Die Cytase der Hyphen von Botrytis scheint, wie derselbe Verfasser angiebt, mit einer Anzahl glänzender, lichtbrechender Körnchen vergesellschaftet zu sein, die Eiweiſsreaktionen geben. Diese treten besonders auf in den Flüssigkeitstropfen, den die Hyphen ausscheiden, wenn sie mit einer frischen Blattoberfläche in Berührung kommen; auſserdem treten sie nur auf, wenn die Hyphen das Enzym secernieren.

Bei den Drüsengeweben der intracellularen Digestion ist der Sekretionsprozeſs nicht annähernd so genau verfolgbar. In einigen Fällen fand gleichzeitig eine Körnung des Protoplasmas der Zelle statt, doch ist dies keinesfalls allgemein. Auch treten die einzelnen Phasen in diesen Fällen nicht so deutlich hervor, denn der Mechanismus der Ausscheidung ist nicht annähernd so gut ausgebildet. Die Zelle, in der der Prozeſs stattfindet, liefert keineswegs nur das Enzym; sie hat auch das Material aufzunehmen und vielleicht vorzubereiten, auf das das Enzym einzuwirken hat, und sie muſs in der einen oder anderen Weise über die Produkte der Digestion Bestimmungen treffen. Diese verschiedenen Funktionen müssen notwendigerweise den Sekretionsprozeſs etwas in den Hintergrund drängen oder doch die Erscheinungen verdunkeln. *Guignards* Untersuchungen über Myrosin deuten in ihren Ergebnissen auf eine wesentliche Ähnlichkeit des Vorganges mit dem bereits beschriebenen hin. Die Myrosin führenden Zellen in den Wurzeln des Meerrettichs und anderer Pflanzen zeichnen sich durch ihren besonders körnigen Inhalt aus, der eine charakteristische Reaktion mit *Millons* Reagens giebt; die Reaktion ist noch stärker als die desselben Reagenses mit Eiweiſs-

Digitized by Google

stoffen. *Guignard* hat einen engen Zusammenhang zwischen dem Grad der Körnung und dem Gehalt der Zellen an Enzymen nachgewiesen.

Der Prozefs der Bildung der Diastase in den Zellen der Laubblätter ist kaum völlig bekannt. Einige Untersuchungen von *A. Meyer* scheinen darauf hinzuweisen, dafs sie nicht in dem gewöhnlichen Protoplasma der Zelle gebildet wird, sondern in den Chromatophoren oder Chlorophyllkörnern. Ein Gleiches hat man beobachtet in Teilen nicht grüner Pflanzen, wo die Diastase in den Leukoplastiden zu entstehen scheint, welche die Stärkekörner bilden. Diese Hypothese stützt sich in der Hauptsache auf das Aussehen der Körner, die zum Teil von den Enzymen gelöst wurden.

Meyer beschreibt viele Fälle, in denen die Stärkekörner am energischsten angegriffen wurden, wenn die Scheide, die durch das Plastidenstroma gebildet wurde, am dicksten war. Bei Iris fand er die Seite der Körner oft angefressen, die mit dem Leukoplasten in Berührung waren.

Meyers Ansicht wurde von *Salter* bestätigt, der eine Reihe von Beobachtungen über die Stärkekörner von *Pellionia* machte. Wenn er die Körner während des Lösungsprozesses untersuchte, fand er, dafs die Wirkung da am weitesten vorgeschritten war, wo der Plastid lag. Letzterer hatte in vielen Fällen seinen Weg in die Substanz des Stärkekorns genommen.

Wenn wir auch so in vielen Fällen imstande sind, die Sekretion der Enzyme mit der Bildung der groben Körnchen in Verbindung zu bringen, so folgt daraus keineswegs, dafs letztere das Enzym selbst sind.

Im Gegenteil ist es wahrscheinlich, dafs dies nicht der Fall ist. Wird der Pankreas aus einem hungernden Hund gleich nach der Tötung herausgenommen und sofort mit einer geeigneten Lösung extrahiert, so weist der erhaltene Auszug geringe oder gar keine enzymatische Kräfte auf. Wird er jedoch einige Stunden erwärmt und wird er insbesondere schwach angesäuert, so ist er sehr wirksam. Wird der unmittelbar nach dem Tod hergestellte Auszug angesäuert und einige Zeit erwärmt, so wird er wirksam. Der aus den Drüsenzellen gewonnene Auszug, der zu den Körnchen in Beziehung steht, wenn er nicht ganz und

Digitized by Google

gar daraus besteht, ist nicht das Enzym selbst, vielmehr ein Körper, aus dem beim Erwärmen mit einer Spur Säure das Enzym entsteht. Diesen Vorläufer des Enzyms hat man „Enzymmutter" oder Zymogen genannt.

Es scheint, als ob jedes Enzym ein bestimmtes Zymogen besitzt, in welcher Form es in den Zellen aufgespeichert ist und welches nach Bedarf direkt in das aktive Enzym übergeführt wird. Diese Umwandlungen scheinen unmitttelbar vor oder vielleicht während seiner Ausscheidung aus der Zelle vor sich zu gehen.

Wir sehen auf diese Weise, dafs die Sekretion der Enzyme ein stufenweiser Prozefs ist. bei dem zum mindesten ein vorgängiger Körper gebildet wird. Können wir diesen Prozefs näher erforschen?

Bei der Betrachtung der Umwandlungen in den Zellen konnten wir fast immer beobachten, dafs der Zellkern bei der Sekretion eine Rolle zu spielen scheint, obwohl wir seine eigentliche Funktion nicht zu erkennen vermochten. Es sei hier an die Sekretion der Diastase durch das Schildchen erinnert. Sobald dieser Prozefs begonnen hat, dauert er ununterbrochen an, er wird nicht unterbrochen, wie der der tierischen Drüsen. Man wird sich erinnern, dafs nach dem Aufhören der Sekretion und dem Verschwinden der Körnung der Zellen der Zellkern zerstört ist.

Hierüber hat *Macallum* ausgedehnte Untersuchungen angestellt, in Verbindung mit der Frage über die Verteilung des Eisens und des Phosphors in den Zellen im allgemeinen.

Er stellte seine Versuche mit dem Pankreas verschiedener Tiere unter Benutzung von Färbemitteln an, die die verschiedenen Teile des Cytoplasmas und des Zellkerns verschieden färbten, ebenso unter Benutzung verschiedener Reagenzien zum Nachweis des Eisens und Phosphors. Er fand, dafs zu einer Zeit, die genau mit dem Beginn der Ablagerung der Zymogenkörnchen in der Zelle zusammenfiel, ein Körper aus dem Zellkern verschwand, der sich mit Eosin deutlich färbte; gleichzeitig entwickelte das Cytoplasma eine Neigung zur Aufnahme des Eosins. Mit anderen Worten: eine eosinophile Substanz diffundierte aus dem Zellkern in die Cytoplasmazone; später scheint dieselbe Substanz auch

Digitized by Google

hieraus wieder entfernt und in den Zymogenkörnchen abgelagert zu werden.

Macallum beobachtete ferner, dafs beim Erscheinen der Zymogenkörnchen in der Zelle letztere am Rande des Lumens am gröfsten waren, während die kleinsten in der Nähe des Zellkerns lagen. Die Körnchen schienen nach ihrer Bildung noch zu wachsen und zwar auf Kosten einer Substanz im Cytoplasma der Drüsenzelle.

Diese Beziehung zwischen dem Zellkern und den Zymogenkörnchen wird durch die schlagende Ähnlichkeit in der chemischen Zusammensetzung noch wahrscheinlicher gemacht. Das Chromatin des Zellkerns enthält Phosphor in chemischer Verbindung. Werden Zellkerne mit künstlichem Magensaft verdaut, so bleibt immer ein phosphorhaltiger Rückstand ungelöst. Dieser ist mit dem darin enthaltenen Nucleïn vergesellschaftet; das Chromatin scheint zu der Klasse der Nucleoalbumine zu gehören. Auch die Zymogenkörnchen in den Zellen des Pankreas von Diemyctylus enthielten nach Entfernung des anhaftenden Lecithins Phosphor, der jedoch darin kaum so fest gebunden war wie in dem Chromatin des Zellkerns. Das Protoplasma, in welchem die Körnchen in der inneren Zone der Zelle lagen, gab auch die Reaktion auf Phosphor, aber lange nicht so deutlich. Die äufsere plasmatische Zone gab eine ungleichmäfsige Reaktion, die nicht von dem Protoplasma selbst herzurühren schien, sondern von einer in seinen Maschen enthaltenen Substanz.

Alle diese verschiedenen Zellenbestandteile enthielten Eisen neben Phosphor und dieses immer im selben Verhältnis. *Macallum* fand, dafs in sehr vielen secernierenden Zellen die Drüsensekretion mit der Gegenwart eines eisenhaltigen Cytoplasmas verbunden war. Hier mögen die Zellen des Pankreas, die Magen- und Darmschleimhäute, ferner die Speicheldrüse von Amblystoma genannt sein; auch die Zellen der submaxillaren (unter der unteren Kinnlade gelegenen) Drüsen und die Hauptzellen der Drüsen des Magenmundes des Hundes und der Katze. In den verschiedenen Phasen der Sekretion änderte sich die Menge der eisenhaltigen Substanz. Wenn die Zellen erschöpft und die Zymogenkörperchen spärlich vorhanden waren, gab das Zytoplasma noch die Reaktion, jedoch nur noch ganz schwach. Die

Digitized by Google

eisenhaltige Zone des Cytoplasmas änderte sich im umgekehrten Sinne wie die Körnchenzone.

Als Ergebnis seiner Versuche stellte *Macallum* die Hypothese auf, dafs der Zellkern aus seinem Chromatin ein Material bildet, das er Prozymogen nennt, und das vom Zellkern in das Cytoplasma ausgeschieden wird. Vor der Ausscheidung kann es sich in der Zellkernsubstanz verbreiten oder zu bestimmten Massen anhäufen, die er Plasmosomata nennt. Bei der Ausscheidung ins Cytoplasma vereinigt sich ein Teil davon mit einem Bestandteil des letzteren und wird zum Zymogen, das sich bald als Körnchen anhäuft. Die Zunahme der Körnchen an Gröfse, so wie sie in der inneren Zone liegen, rührt von einer weiteren Zufuhr aus dem Prozymogen dieses Teiles her.

Macallum ist weiterhin der Ansicht, dafs das Chromatin des Zellkernes ein eisenhaltiges Nucleoalbumin ist, worin das Eisen mit dem Nuclein verbunden ist.

In derartigen Zellen erscheint daher der Sekretionsprozefs mit den Bestandteilen des Zellkernes aufs engste verknüpft zu sein. Gleichzeitig ist das Zymogen nicht lediglich ein Produkt des Zellkernes, indem das Cytoplasma der Zelle in letzter Linie zu seinem Aufbau mit beiträgt.

Macallum beobachtete ein ähnliches Vorkommen von Eisen in einigen Protozoen. Wir sahen, dafs diese einzelligen Organismen wahrscheinlich ihre Nahrung mit Hilfe von Enzymen verdauen, die in bestimmte, die unverdauten Teilchen einschliefsende Vakuolen abgesondert werden. Aus seinen Beobachtungen hält er es für wahrscheinlich, dafs hier dieselben Beziehungen obwalten wie in den Drüsenzellen zwischen einem Zymogen und einem eisenhaltigen Körper, der in den Maschen ihres Cytoplasmas enthalten ist.

Andere Forscher haben die Ansicht ausgesprochen, dafs die Sekretion der Enzyme als ein stufenweiser, in verschiedenen Phasen verlaufender Prozefs aufzufassen sei. Im Jahre 1882 sagte *Langley* im Journal of Physiology 3, 290 folgendes: „Aus den *Brücke*schen Beobachtungen lassen sich hinsichtlich der Beziehungen des Pepsins zu den Drüsenzellen weitere Schlüsse ziehen. *Brücke* fand, dafs ein fortgesetztes Extrahieren mit Wasser aus den Drüsenzellen nicht alles Pepsin entfernt; das

Digitized by Google

verbleibende Gewebe giebt bei der Behandlung mit verdünnter Salzsäure noch einen pepsinhaltigen Auszug. Er stellte aufserdem fest, dafs nach der Behandlung der Magenschleimhaut mit verdünnter Salzsäure bis zum vollständigen Zerfall, der verbleibende Rückstand bei weiterer Behandlung mit Salzsäure einen pepsinhaltigen Auszug liefert. Wir können kaum annehmen, dafs dies möglich ist, wenn das Zymogen in den Zellen nur in einem Zustand enthalten wäre. Ich denke mir die Sache so: Das Protoplasma der Drüsenzellen bildet nicht auf einmal Zymogen, wie es unmittelbar vor seiner Verwandlung in Pepsin der Fall ist, sondern bildet gewisse Zwischenkörper, in denen die Zymogen-Radikale mehr und mehr isoliert werden. Da das Zymogen die Radikale des Enzyms enthält, so erhält man das letztere mit gröfserer Schwierigkeit aus dem unvollkommen vorbereiteten Zymogen; d. h. je weiter wir zum Protoplasma aufsteigen, in um so geringerer Menge und um so schwieriger geht die Enzymbildung vor sich. Die letzten Spuren des Enzyms, die man bei wiederholten Extraktionen erhält, rühren meiner Ansicht nach von einer Substanz her, die im Begriff stand, in Zymogen überzugehen."

Wenden wir nun unsere Aufmerksamkeit den Beziehungen zwischen Zymogenen und Enzymen zu, ebenso den Unterschieden, die zwischen beiden bestehen.

Die Annahme, dafs die Körnchen aus Zymogen und nicht aus Enzym bestehen, gründet sich, wie wir sahen, auf den Vergleich der Fermentativkraft eines frischen Gewebes vor und nach der Erwärmung mit verdünnter Säure. Einen überzeugenden Beweis hat *Langley* in Verbindung mit seinen Untersuchungen über die Histologie der Magendrüsen der Säugetiere beigebracht. Er fand, dafs Pepsin beim schwachen Erwärmen mit einer 1 prozentigen Sodalösung schnell zerstört wird, und er benutzte diese Eigentümlichkeit zur Prüfung des Inhaltes einer Schleimhaut. Bei einem schlagenden Versuch benutzte er einen Auszug aus der Schleimhaut aus dem Grunde und der grofsen Kurvatur des Magens eines Kaninchens, die gepulvert und $2^1/_2$ Stunden mit Wasser bei 32° C. digeriert wurde. Er teilte den filtrierten Auszug in zwei Teile, den einen erwärmte er bei 32° C. 50 Minuten lang bei Gegenwart von 0,06 % Salzsäure und neutrali-

Digitized by Google

sierte dann mit verdünntem Alkali. Hierdurch würde ein im Auszug etwa vorhandenes Zymogen in Pepsin übergeführt werden. Gleichzeitig fügte er der anderen Hälfte die gleiche Menge Säure und Alkali auf einmal zu. Die beiden Auszüge bezeichnet er mit P und Z. Sie unterscheiden sich von einander nur dadurch, dafs P vor dem Alkalizusatz mit verdünnter Salzsäure erhitzt worden war, was bei Z nicht der Fall war. Er fügte dann zu je 10 ccm beider Auszüge ein gleiches Volumen 2prozentiger Sodalösung und hielt dann 15 Minuten bei 39° C. Dann wurde neutralisiert, zu 0,2 % Salzsäure angesäuert und Fibrin zugegeben. P verdaute nur eine Spur, während Z von aufserordentlicher peptischer Wirkung war.

Die aus den Drüsen extrahierte Substanz war in Z nicht durch eine voraufgegangene Behandlung mit Säure verändert worden; sie wurde durch die Sodalösung nicht zerstört, sondern wurde durch die spätere Behandlung mit Säure wirksam und verdaute das Fibrin. Dieselbe Substanz in P war von der Behandlung mit Alkali einige Zeit der Wirkung der Säure unterworfen worden und wurde offenbar durch das Alkali zerstört, denn die neutralisierte und dann angesäuerte Flüssigkeit besafs keine verdauende Wirkung. Das extrahierte Material lieferte beim Erwärmen mit Säure Enzym, wie bei Z gezeigt wurde. Bei P bildete sich dieses Enzym bei dem erstmaligen Erwärmen mit verdünnter Säure und wurde dann durch das Alkali zerstört. Die Substanz war zur Zeit der Extraktion noch nicht Enzym, sonst würde sie bei Z ebenfalls zerstört worden sein. In dem Zustand, in dem sie im ursprünglichen Magensaft vorhanden war, hatte Soda keine Einwirkung auf die Substanz.

Durch diesen Versuch erbrachte *Langley* den Nachweis, dafs die körnige Substanz, die aus den Drüsen extrahiert wurde, nicht Pepsin ist, sondern ein Vorläufer desselben, ein Zymogen; er zeigte ferner den Unterschied zwischen letzterem und dem Enzym bezüglich ihres Verhaltens gegen verdünnte Alkalien.

Das Zymogen, das den Vorläufer des Pepsins darstellt, nannte man Pepsinogen.

Langley zeigte auf ähnliche Weise, dafs die Magendrüsen des Hundes, Schafes, Maulwurfes, der Schlange, des Frosches und des Wassermolches kein Pepsin, sondern Pepsinogen enthalten.

Digitized by Google

Das Pepsinogen kann nicht nur durch verdünnte Säuren, sondern auch durch verdünnte Alkalien in Pepsin übergeführt werden. Letztere müssen aber sehr verdünnt sein, sonst wird das Pepsin sofort nach seiner Bildung zerstört.

Heidenhain zeigte im Jahre 1875, dafs der Pankreassaft Trypsinogen und nicht Trypsin enthält und dafs ersterer durch Behandlung mit Säuren in dieses übergeführt werden konnte. Ein wässeriger Auszug der Pankreasdrüsen erlangt langsam tryptische Fähigkeiten.

Hammarsten zeigte im Jahre 1872, dafs das Labenzym des Magens auch von einem Zymogen abstammt. *Langley* bestätigte diese Beobachtung im Jahre 1881. Er stellte einen Auszug aus der Schleimhaut dar, wobei er 0,1 prozentige Sodalösung als Extraktionsflüssigkeit benutzte. Wurde ein Teil dieses Auszugs angesäuert, 15 Minuten erwärmt und dann wieder alkalisch gemacht, so veranlafste er schnell die Gerinnung der Milch, während der ursprüngliche Auszug, ohne mit Säure erwärmt zu sein, eine derartige Fähigkeit nicht besafs. Es war nötig, mit schwach alkalischer Lösung zu arbeiten, da eine auch nur ganz geringe Säuerung eine Fällung des Kaseïns bewirkt. Die Flüssigkeit darf aber auch nur ganz schwach alkalisch sein, da das Labzymogen bereits von 0,1 prozentiger Sodalösung zerstört wird. Es besteht hier zwischen Zymogen und Enzym nicht der Unterschied wie beim Pepsin und seinem Vorläufer.

Der Nachweis der Existenz des Zymogens der Speicheldiastase ist nicht so bündig, obwohl die Analogie mit anderen Sekretionen auf die Existenz hindeutet, die auch noch durch andere Vorgänge in den Speicheldrüsen wahrscheinlich gemacht wird. *Goldschmidt* hat das Zymogen im Pferdespeichel nachgewiesen. Gewisse Thatsachen, die dieser Forscher beobachtete, deuten auch auf sein Vorkommen im menschlichen Speichel. Der Nachweis im menschlichen Speichel ist nicht leicht zu führen, da die Sekretion grofse Mengen fertig gebildeter Diastase enthält. Der Speichel wurde vom Schleim befreit, stark verdünnt und mit 0,2 % Cyankalium versetzt. Dieses Antiseptikum leistete bei der Konservierung des Speichels gute Dienste; dieser behielt, auf solche Weise behandelt, mehrere Monate seine ungeschwächte Wirksamkeit. Der so vorbereitete Speichel wurde in zwei Teile

Digitized by Google

geteilt; der eine wurde 21 Tage bei 30° C. im Thermostaten gehalten, während der andere bei Laboratoriumstemperatur verblieb. In gewissen Zwischenräumen wurden je 2 ccm der beiden Speichelpräparate zu 20 ccm 1 prozentigem Stärkekleister gegeben und der gebildete Zucker mit *Fehling*scher Lösung titriert.

Die nachstehende Tabelle giebt die Ergebnisse des Versuches wieder:

Versuchsdauer Tage	2 ccm des erwärmten Speichels bildeten mit 20 ccm Stärkekleister Zucker, entsprechend Gramm Kupferoxyd	2 ccm des nicht erwärmten Speichels bildeten mit 20 ccm Stärkekleister Zucker, entsprechend Gramm Kupferoxyd
1	0,0565	0,045
3	0,0697	0,045
8	0,067	0,062
9	0,0706	0,0708
15	0,066	0,095
21	0,032	0,094

Aus diesen Ergebnissen schliefst der Versuchsansteller, dafs der Speichel aufser einer gewissen Menge Diastase eine kleine Menge Zymogen enthält, das beim Erwärmen auf 38° in drei Tagen fast ganz umgewandelt wurde. Möglicherweise blieb etwas davon unverändert bis zum neunten Tage. Nach 15 Tagen begann sich das Enzym bei dieser Temperatur zu verändern, indem es an hydrolytischer Kraft einbüfst, die nach Verlauf von 21 Tagen bedeutend geringer war als zu Beginn des Versuches. Bei Laboratoriumstemperatur, etwa 18° C., wurde das Zymogen noch am dritten Tage in Enzym übergeführt, dann schritt diese Umwandlung stufenweise während der ganzen Versuchsdauer weiter. Bei dieser Temperatur fand während der ganzen Zeit keine Zerstörung des Enzyms statt, so dafs die Kurve der Wirksamkeit des Speichels in diesem Falle etwas steiler verlief als die des erwärmten Auszuges, bei dem, während eines Teiles des Versuches, beide Prozesse gleichzeitig verliefen.

Einige Versuche, die der Verfasser über die Wirkung des Lichtes auf verdünnten Speichel anstellte, weisen ebenfalls auf die Existenz eines Zymogens im Speichel hin.

Digitized by Google

Ein in der bereits beschriebenen Weise dargestelltes Speichelpräparat, das ebenfalls mit Cyankalium konserviert wurde, wurde einige Stunden den Strahlen des elektrischen Bogenlichtes ausgesetzt und zwar auf eine solche Entfernung, dafs keine Erwärmung stattfand.

Durch Benutzung verschiedener Schirme wurde die Wirkung verschiedener Teile des Spektrums für sich geprüft. Die Schirme waren nach den Angaben von *Landolt* („Methode zur Bestimmung der Rotationsdispersion mit Hilfe von Strahlenfiltern". Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1894, S. 2872) hergestellt. Die zu diesem Zweck benutzten gefärbten Flüssigkeiten ermöglichten eine Einteilung der Strahlen des Spektrums in sieben Arten: infra-rot, rot, orange, grün, blau, violett, ultra-violett. Die roten Strahlen enthielten Strahlen von einer Wellenlänge von 710—645 $\mu\mu$, die orangen von 645—585 $\mu\mu$, die grünen von 585—500 $\mu\mu$, die blauen von 500—430 $\mu\mu$ und die violetten solche des sichtbaren Spektrums unter 430 $\mu\mu$.

Nach dieser Zeit, während welcher die Temperatur des Speichels von einem Maximumthermometer registriert wurde, liefs man 5 ccm des Präparates auf 20 ccm 1 prozentiger löslicher Stärke einwirken. Ein Kontrollversuch wurde in allen Fällen angestellt mit demselben Speichel, der von der elektrischen Lichtquelle nur durch einen dunklen Schirm getrennt war. Die Tabelle auf S. 393 zeigt die Wirkung des Lichtes.

Diese Ergebnisse müssen mit einiger Vorsicht aufgenommen werden, da es mit den verschiedenen Schirmen nicht leicht war, ein in allen Fällen gleichmäfsig starkes Licht zu erhalten, so vorsichtig man auch verfahren mochte. Es stellte sich jedoch heraus, dafs kleine Unterschiede in der Intensität einen ganz ausgesprochenen Einflufs während der Expositionsdauer ausübten.

Eine weniger sorgfältige Trennung der Lichtstrahlen ergab, dafs das rote Ende des Spektrums auch den Diastasegehalt eines frisch bereiteten Malzauszuges erhöhte.

Aus diesen Versuchen schliefst der Verfasser, dafs der Speichel ein Zymogen enthält, das durch Einwirkung der roten Strahlen des Spektrums sehr schnell in Diastase übergeführt werden kann. Die infra-roten, orangen und blauen Strahlen besitzen eine ähnliche, wenn auch weniger deutliche Wirkung.

Digitized by Google

Untersuchter Streifen	Gramm Kupferoxyd. nach Korrektur für infra-rote Strahlen	Gramm Kupferoxyd erhalten mit der nicht exponierten Lösung	Zunahme (+) bezw. Abnahme (—) an Kupferoxyd	Zunahme oder Abnahme an Diastase %	Mittlere Zu- oder Abnahme %
Rot	0,0557	0,0354	+ 0,0203	+ 57,4	
720—640 $\mu\mu$	0,0565	0,0393	+ 0,0172	+ 43,7	
	0,0921	0,0568	+ 0,0353	+ 62,1	
	0,0518	0,0343	+ 0,0175	+ 51,0	+ 53,5
Orange	0,0338	0,0323	+ 0,0015	+ 4,6	
640—585 $\mu\mu$	0,0296	0,0282	+ 0,0014	+ 4,9	+ 4,75
Grün	0,0285	0,0333	— 0,0048	— 14,4	
585—500 $\mu\mu$	0,0107	0,0129	— 0,0022	— 17,0	— 15,7
Blau	0,0282	0,0242	+ 0,0040	+ 16,5	
500—430 $\mu\mu$	0,0711	0,0568	+ 0,0143	+ 25,1	+ 20,8
Infra-Rot	0,0337	0,0323	+ 0,0016	+ 5,0	
	0,0323	0,0282	+ 0,0047	+ 16,6	+ 10,8

Die anderen Strahlen, insbesondere die violetten und ultravioletten, zerstören die Diastase fast ebenso wirksam, wie eine Temperatur von 70° C.

Die Zymogene der pflanzlichen Enzyme sind bislang noch nicht sehr eingehend studiert worden. Ihre Existenz wurde zuerst von *Vines* bei seinen Versuchen über Nepenthes nachgewiesen. Er behandelte einige Becher dieser Pflanze mit 1 prozentiger Essigsäure 24 Stunden lang und zog diese dann, gleichzeitig aber auch nicht mit Essigsäure behandelte Becher, mit Glycerin aus. Der erste Auszug besafs gröfsere proteolytische Wirksamkeit als der zweite, woraus er auf die Anwesenheit eines Zymogens in den Drüsen schlofs, das durch die Säure in ein Zymogen übergeführt wurde.

Die Versuche des Verfassers über den Vorläufer des Enzyms in den ruhenden Samen der Lupine läfst auf ähnliches schliefsen, obwohl seine Identifizierung nicht so leicht ist, da hier die gewöhnlich herangezogene Behandlung mit Säure nicht brauchbar ist, da die Digestion eine zu lange sein und die Digestion in saurem Medium durchgeführt werden mufs. Man wies das Zymogen

Digitized by Google

noch durch eine Modifikation der Methode nach, die *Langley* beim Nachweis des Pepsinogens des Magens benutzte und die sich auf die Zerstörung des Enzyms durch verdünnte Alkalien gründet, die das Zymogen nicht angreifen.

Leichter ist schon der Nachweis zu führen, dafs die Inulase in Form eines Zymogens in der ruhenden Knolle der Artischocke vorhanden ist. Bei des Verfassers Versuchen wurden einige Stücke ausgewachsener Knollen 24 Stunden bei 35 ° C. gehalten. Ein alsdann daraus bereiteter Auszug führte Inulin in Zucker über, während ein Auszug aus vorher nicht erwärmten Knollen unwirksam war. Wurde jedoch dieser Auszug einige Zeit mit einer Lösung von Acidalbumin in 0,2 prozentiger Salzsäure erwärmt, so wurde etwas Enzym darin entwickelt, wenn auch weniger, als beim Erwärmen der Knollen vor der Extraktion. Eine Behandlung mit Säure allein war bei der Inulase nutzlos, da die zur Umwandlung des Zymogens erforderliche Säuremenge das freigewordene Enzym tötete.

Auch die Lipase und das Labenzym des Ricinussamens existieren bis zum Beginn der Keimung als Zymogen, wie man durch Einwirkung von Säuren fesstellen kann; erstere wird auch durch längere Behandlung mit Wasser ohne Säure in das Enzym übergeführt.

Brown und *Morris* geben an, dafs die Menge der durch das Epithelium des Schildchens der Gerste ausgeschiedenen Diastase um 20 % durch die Anwesenheit sehr verdünnter Ameisensäure vermehrt wird. *Baranetzky* fand, dafs ein frisch bereiteter Auszug aus den Blättern von Melianthus major Stärke nicht zu verzuckern vermochte, nach ein paar Tage langem Stehen aber diastatisch geworden war. Bei den Kartoffelknollen stellte er dasselbe fest.

Versuche von *Reychler, Lintner* und *Eckhardt* deuten auf die Existenz eines Zymogens in den Zellen des Weizenkornes hin. Sie fanden, dafs durch Einwirkung verdünnter Säure auf Weizenkleber ein diastatisches Enzym gebildet wurde. Der Versuch scheint jedoch nicht ganz beweiskräftig zu sein, da möglicherweise der Kleber etwas Translokationsdiastase enthielt, die, wie wir sahen, im reifen Endosperm vorhanden ist, wenn auch nur in ganz kleiner Menge.

Digitized by Google

Frankhauser beobachtete, dafs während der Keimung der Gerste kleine Mengen Ameisensäure in den Körnern nachgewiesen werden können. Dies mag in Bezug auf die Zunahme der diastatischen Kraft beim Keimen wichtig sein, da diese Säure wahrscheinlich das Zymogen in das Enzym überführt.

Viele Forscher vermuteten, dafs die Thrombase oder das Fibrinenzym ebenfalls in Form eines Zymogens existiert; bislang ist aber ein sicherer Beweis dafür noch nicht geliefert.

Die bestimmtesten Angaben über den vorliegenden Gegenstand machte *Pekelharing*, der behauptete, aus oxaliertem Plasma eine in vieler Hinsicht dem Globulin ähnliche Substanz dargestellt zu haben, die jedoch keine fibrino-plastischen Eigenschaften besitzt; nach Zufügung von Chlorcalcium erlangt sie die Fähigkeit Fibrinlösungen zu koagulieren. *Pekelharing* hält diese Substanz für ein Zymogen; er giebt an, dafs sie beim Verbrennen eine Asche liefert, die kein oder nur wenig Calcium enthält, während die Thrombase sehr reich ist an Calcium. *Pekelharing* hält diese Substanz, ebenso wie *Halliburtons* Thrombase, für ein Nucleoalbumin. Er konnte sie aus dem Plasma mittelst Essigsäure ausfällen. Nach ihm liefern eine Anzahl von Körpern, die zuerst von *Wooldridge* untersucht und von diesem Gewebe-Fibrogene genannt wurden und die eine Koagulation des Blutes in den lebenden Blutgefäfsen bewirken können, bei der Behandlung mit Chlorcalcium Thrombase. *Pekelharing* glaubt, dafs diese Körper das Zymogen enthalten.

Er erklärt die Fähigkeit des Peptons, die Koagulation des Blutes zu hemmen, durch die Annahme, dafs dieser Eiweifsstoff eine starke Verwandtschaft zu den Kalkverbindungen besitzt und daher bei der Einführung in das Blut die Reaktion zwischen dem im Blut enthaltenen Zymogen und den ebenfalls im Blut vorhandenen Calciumverbindungen hintertreibt. Infolgedessen bildet sich keine Thrombase, und das Blut gerinnt nach dem Ablassen nicht. Er führt als Beweis für die Richtigkeit seiner Annahme eine Behauptung von *Munck* an, nach welcher Seife, die sich ebenfalls mit Kalksalzen umsetzt, sich beim Einführen ins Blut ganz ähnlich wie das Pepton verhält. Alle hemmenden Einflüsse, die das Pepton beim Einführen ins Blut bewirkt, werden aufgehoben durch die gleichzeitige Einführung von Kalksalzen.

Digitized by Google

Pekelharing vermutet, dafs die Gerinnung innerhalb der Gefäfse durch eine rasche Umwandlung des Zymogens in Enzym bewirkt wird. Er giebt an, dafs das Pepton die Koagulation in dem sich in den Gefäfsen befindlichen Plasma verhindert, wenn es so schnell eingeführt wird, dafs das Zymogen nicht die Zeit hat, sich mit dem Kalksalz zur Bildung des Enzyms zu verbinden.

Diese Ansicht steht jedoch nicht mit der von mehreren Forschern beobachteten Thatsache im Einklang, dafs eine Einführung sehr starker Thrombaselösungen in die Blutgefäfse eines lebenden Kaninchens keine intravaskuläre Gerinnung zur Folge hat.

Nach *Pekelharing* wird die Umwandlung des Zymogens in Thrombase durch eine wirkliche Verbindung mit dem Kalksalz zu Wege gebracht. Er giebt weiter an, dafs das Fibrin selbst eine Kalkverbindung sei, und dafs die Hauptwirkung des Enzyms die Übertragung des Calciums auf das Fibrinogen zu sein scheine.

Hammarsten bekräftigt *Pekelharings* Ansicht bezüglich der Beziehungen des Zymogens zur Thrombase, er widerspricht jedoch der Annahme, dafs Fibrin eine Kalkverbindung des Fibrinogens sei, da er fand, dafs Fibrin und Fibrinogen gleiche Mengen Kalk besitzen.

Die eigentlichen Unterschiede zwischen Zymogenen und Enzymen sind noch nicht klargestellt. *Langley* und *Edkins* stellten Vergleiche an zwischen Pepsinogen und Pepsin und fanden, was beinahe zu erwarten war, dafs sie vieles gemein haben. Ihr Verhalten gegen verdünnte Alkalien ist bereits erwähnt worden. Beide werden schliefslich von Alkalien und alkalischen Salzen zerstört; die Zerstörung des Pepsinogens erfolgt jedoch viel langsamer als die des Pepsins. In Abwesenheit von Säuren, die das Zymogen rasch in das Enzym verwandeln, ist das Pepsinogen ziemlich beständig. In neutralen und schwach alkalischen Lösungen geht seine Umwandlung sehr langsam vor sich, und in Glycerinauszügen hält es sich jahrelang unverändert.

Beim Durchleiten von Kohlensäure durch eine Pepsinogen enthaltende Lösung wird letzteres ziemlich schnell zerstört, bei einstündigem Durchleiten verbleibt noch etwas Pepsinogen. Der Grad der Zerstörung wird erhöht durch die Gegenwart einer kleinen Menge von Magnesiumsulfat; am wirksamsten ist in dieser Beziehung eine 0,1 prozentige Lösung. Pepton auf der anderen

Digitized by Google

Seite hemmt zum grofsen Teil die Zerstörung, und bei Gegenwart von 0,25 $^0/_0$ verhindert es sie durchaus. Andere Eiweifsstoffe haben eine ähnliche Wirkung, sie sind jedoch in dieser Beziehung nicht so wirksam als Pepton.

Kohlensäure hat auf Pepsin eine weit schwächere Wirkung.

Pepsinogen wird, ebenso wie das Pepsin, beim Erhitzen seiner Lösung auf etwa 55—60° schnell zerstört.

Digitized by Google

Kapitel XXIII.

Die Konstitution der Enzyme.

Unsere Kenntnisse über die Konstitution oder Zusammensetzung der Enzyme sind noch sehr dürftig. Dies hat hauptsächlich zwei Ursachen. Erstlich sind sie sehr unbeständige Körper, die sehr schnell Zersetzung erleiden. Die seither vorgeschlagenen Methoden zur Darstellung der Enzyme in reinem Zustande sind mannigfaltiger Art, sie alle haben aber das eine gemeinsam, daſs sie stets von einem groſsen Verluste von enzymatischer Kraft begleitet sind, da die Enzyme während der ersten Extraktion oder der späteren Reinigung zu weitgehend zerstört werden. In zweiter Linie macht sich eine Schwierigkeit geltend, die eine groſse Bedeutung hat, aber nicht in der Arbeitsweise begründet ist. Wir haben nämlich kein Kriterium für ihre Reinheit, und wir können nicht sagen, nach diesem oder jenem Prozeſs läſst sich ein reines Enzym darstellen.

Aus der Ähnlichkeit ihrer Wirkungsweise mit der des lebenden Plasmas, die wir in einem früheren Kapitel besprochen haben, lieſse sich sehr wohl schlieſsen, daſs sie möglicherweise selbst Eiweiſsstoffe, oder doch mit diesen sehr nahe verwandt sind. Ihre Unbeständigkeit, die Veränderungen, die sie beim Erhitzen erleiden, ihr allgemeines Verhalten verdünnter Säuren und Alkalien gegenüber sprechen ebenfalls zugunsten dieser Annahme.

Soweit als es möglich war, die Enzyme frei von Bemengungen bekannter Substanzen darzustellen, geben sie, mit einigen wenigen zweifelhaften Ausnahmen, die allgemeinen Eiweiſsreaktionen. Vor allem färben sich ihre Lösungen bei der Behandlung mit Salpetersäure und Ammoniak gelb, d. h. sie geben die sogenannte Xanthoproteïn-Reaktion.

Digitized by Google

Besondere, nur für sie charakteristische Reaktionen besitzen die Enzyme ganz und gar keine, und die einzige Methode des Nachweises derselben in irgend einer Lösung besteht darin, dafs man diese auf gewisse Substanzen einwirken läfst und prüft, ob sich die für die einzelnen Enzyme charakteristischen Umwandlungen abgespielt haben.

Man hat zwar nach charakteristischen Reaktionen gefahndet, und verschiedene Forscher wollten sie auch gefunden haben; weitere Prüfungen ergaben aber stets das Unzulängliche der Methode.

Unter den Forschern, die bestimmte Reaktionen für die Enzyme gefunden haben wollten, ist in erster Linie *Wiesner* zu nennen. Nach ihm geben sie eine charakteristische Farbenreaktion beim Erhitzen mit einer alkoholischen Orcinlösung bei Gegenwart von Salzsäure. Aber damit noch nicht genug; er behauptet auch, dafs hierbei verschiedene Enzyme verschiedene Färbungen liefern und dafs man die Enzyme nach seiner Methode unterscheiden könne; so gab Diastase eine bläulich-violette Färbung.

Guignards Untersuchungen bewegten sich in derselben Richtung; er behauptet, dafs schon durch blofse Behandlung mit Salzsäure allein die Enzyme als eine bestimmte Klasse nachgewiesen und viele derselben identifiziert werden könnten. Er kochte 1 cg verschiedener Enzyme mit 1 ccm reiner Salzsäure; Diastase soll dabei eine rote Reaktion liefern, die allmählich nach bräunlich umschlägt; Emulsin gab eine violette, Papaïn eine orangerote und Trypsin eine grünlich-gelbe Reaktion.

Diese Farbenreaktionen sind jedoch, wie sich herausgestellt hat, auch noch für viele andere Körper aufser den Enzymen charakteristisch. *Reinitzer* wies nach, dafs Dextrin, Maltose und Laktose ähnliche Reaktionen bei dieser Behandlung liefern. Die *Wiesner*schen Farbenreaktionen liefern viele Substanzen, die zumeist in den Pflanzengeweben vorkommen, die gleichzeitig Enzyme enthalten. Die Orcinreaktion liefern fast alle Kohlenhydrate; sie scheint auf eine Furfurolbildung während des Kochens mit Salzsäure zurückzuführen zu sein. *Udransky* erhielt dieselbe Reaktion mit verschiedenen Eiweifsstoffen. Wahrscheinlich lieferten bei den *Wiesner*schen Präparaten einige dieser Körper, die von den

Digitized by Google

Enzymen nicht getrennt worden waren, diese Reaktion, die also für letztere ganz und gar nicht charakteristisch waren.

Guignard beschreibt die Einwirkung der Salzsäure für sich auf verschiedene Eiweifsstoffe und findet, dafs diese Farbenreaktionen liefern, die den den Enzymen zugeschriebenen Reaktionen sehr ähnlich sind.

Guignard machte auf gewisse Reaktionen aufmerksam, die Myrosin enthaltende Zellen liefern. Beim Erhitzen eines Schnittes, der diese Zellen enthielt, mit kleinen Mengen von *Millon*schen Reagens (einem Gemisch der beiden Quecksilbernitrate mit freier Salpetersäure) färbten sich die in Rede stehenden Zellen schnell mehr oder weniger lebhaft rot, während das Protoplasma der umgebenden Zellen sich viel langsamer und dabei niemals so intensiv färbte. Der Inhalt der Myrosin enthaltenden Zellen wurde fernerhin durch das Reagens in körniger Form ausgeschieden, so dafs sie sich von den übrigen ganz deutlich abhoben.

So schlagend auch diese Reaktion ist, so kann sie doch nicht als eine für das Enzym charakteristische angesprochen werden, denn sie kann auch ebenso gut von anderen Bestandteilen der Zelle herrühren. Sie kann wohl dazu dienen, nachzuweisen, wo sich das Myrosin befindet, sie kann aber ebenso gut von einer das Enzym begleitenden Substanz herrühren.

Im Jahre 1868 stellte *Schönbein* fest, dafs beim Vermischen von Diastase mit etwas Guajakharz und etwas Wasserstoffsuperoxyd eine blaue Färbung entsteht. Andere Forscher dehnten diese Reaktion auf andere Enzyme aus; viele Forscher hielten diese Reaktion für charakteristisch für die ganze Diastasegruppe, obwohl sie für die einzelnen Enzyme keine bestimmten Erscheinungen liefert. *Lintner* zeigte im Jahre 1886, dafs die Reaktion empfindlicher ist, wenn an Stelle des Guajakharzes dessen alkoholische Lösung benutzt wird.

Diese Reaktion ist, ebenso wie die anderen, keineswegs für die Diastase charakteristisch. Sie hat lange zum Nachweis von Blutflecken gedient, ebenso zum Nachweis von Eiweifsstoffen im Harn. *Pawlewski* prüfte die Methode im Jahre 1897 eingehend auf ihre Brauchbarkeit zum Nachweis der Enzyme und fand, dafs ganz ähnliche Reaktionen auch das Pepton, Albumin und andere

Digitized by Google

native Eiweifsstoffe liefern, ebenso auch Gelatine. Selbst der Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd allein zu Guajaktinktur lieferte eine Blaufärbung, die in der Wärme sofort auftrat, in der Kälte sich jedoch langsam entwickelte. Andere Oxydationsmittel aufser Wasserstoffsuperoxyd, z. B. Ozon, Chlor, Salpetersäure und Kaliumpermanganat geben ebenfalls mit der Tinktur eine Blaufärbung.

Zum besonderen Nachweis der Diastase oder anderer Enzyme ist dies Reagens wertlos, denn sie gestattet keinen Schlufs auf die Natur des anwesenden Körpers, auch wenn die Blaufärbung auftritt.

Besieht man sich alle Reaktionen näher, die zum Nachweis der Enzyme angegeben worden sind, so sieht man, dafs sie alle mehr oder weniger Eiweifs-Reaktionen sind. *Wiesners* Enzympräparate waren wohl alle nicht ganz rein, sie waren jedenfalls mit Kohlenhydraten und Eiweifsstoffen verunreinigt.

Es wird behauptet, die Zymogene seien Eiweifsstoffe aus denen die Enzyme durch Oxydation entstehen. *Heidenhain* nahm an, dafs das Zymogen das Enzym in Verbindung mit einem eiweifsartigen Körper sei. Weitere Forscher sprachen die Ansicht aus, dafs die Enzyme selbst Eiweifsstoffe seien. *Loew* hält sie für Verwandte des Peptons. Zur Bekräftigung dieser Hypothese wird angeführt, dafs ein enzymhaltiger Auszug nach Entfernung aller Eiweifsstoffe durch Fällung nach der Filtration nur noch schwache enzymatische Kraft besitzt; letztere verringert sich oft in demselben Mafse als Eiweifs aus der Lösung ausgeschieden wird.

Man darf jedoch hierauf nicht allzuviel Gewicht legen, da man oft findet, dafs ein Niederschlag, selbst ein solcher von ganz indifferentem Material, der in einer Enzym enthaltenden Lösung erzeugt wird, das Enzym gewöhnlich mit ausfällt und niederreifst. Man hat von dieser Eigentümlichkeit, wie wir sahen, bei der Ausarbeitung von Methoden zur Reindarstellung der Enzyme Gebrauch gemacht, hauptsächlich im *Brücke*schen Verfahren zur Darstellung des Pepsins.

Beweiskräftiger ist schon die Thatsache, dafs die Temperatur, bei der viele Enzyme zerstört werden, mit der Gerinnungstemperatur der Eiweifsstoffe zusammenfällt.

Die meisten Methoden zur Darstellung der Enzyme laufen darauf hinaus, Eiweifskörper aus ihren Lösungen auszufällen. Die

Digitized by Google

zwei hauptsächlichen Methoden zur Fällung der Enzyme bestehen in der Zufuhr eines Alkoholüberschusses zur Lösung und deren Sättigung mit neutralen Salzen. Auf diese Weise werden auch die Eiweifsstoffe gefällt, und die Enzyme, falls sie vorhanden sind, fallen mit aus. Die Versuche zeigen nicht, ob der Eiweifsstoff und das Enzym identisch sind, oder ob letzteres nur mechanisch mit ersterem vergesellschaftet ist. Es ist jedoch bemerkenswert, dafs der Alkohol bei längerer Einwirkung die Eiweifsstoffe koaguliert und dafs auf demselben Wege die enzymatische Kraft zerstört wird.

In einigen Fällen fand man ein besonderes Enzym und einen bestimmten Eiweifsstoff so konstant und eng vergesellschaftet, dafs man zur Annahme geführt wurde, beide seien identisch.

Osborne hat die Vergesellschaftung von Diastase mit Eiweifsstoffen in den Getreidearten Weizen, Roggen und Gerste näher studiert. In allen fand er einen Eiweifsstoff, den er Leukosin nannte, neben einem Globulin und einer Albumose. Alle Enzymauszüge, die er aus diesen Getreidearten darstellte, enthielten ein Gemenge dieser Eiweifsstoffe; wurden diese jedoch nach verschiedenen Methoden getrennt, so wohnte die gröfste diastatische Kraft dem Leukosin inne. Die Albumose war auch noch in einem gewissen Grade mit dem Enzym vergesellschaftet, in viel geringerem jedoch wie das Leukosin. Auch die Menge des Leukosins stand in einem gewissen, wenn auch nicht ganz engen Zusammenhang mit der enzymatischen Kraft.

Osborne kam zu dem Schlufs, dafs die Diastase entweder das Leukosin selbst oder eine Verbindung desselben mit einem anderen Körper, wahrscheinlich der Albumose ist, dafs dieser Körper beim Erhitzen zerfällt und dabei in koaguliertes Eiweifs übergeht, wobei gleichzeitig etwas freies Albumin ebenfalls koaguliert.

Diese Ansicht kann nicht als erwiesen gelten, da einige seiner Lösungen, die nur die Albumose enthielten, eine gewisse, wenn auch verhältnismäfsig schwache diastatische Kraft aufwiesen.

Chittenden zeigte, dafs das Bromelin und das Labenzym im Ananassaft wahrscheinlich mit zwei bestimmten Eiweifsstoffen vergesellschaftet sind, obwohl er nicht behauptet, dafs eines der

Digitized by Google

beiden Enzyme mit diesen Eiweifsstoffen identisch ist. Bromelin, das proteolytische Enzym, kommt meistens in der Gesellschaft eines Eiweifsstoffes vom Charakter einer Proto-Albumose vor. Es wird aus neutraler Lösung durch Sättigung mit Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat oder Kochsalz gefällt. Es ist löslich in Wasser und wird infolgedessen durch Dialyse nicht gefällt. Es wird ferner durch lange Berührung mit Alkohol nicht koaguliert, und seine wässerige Lösung wird durch Erhitzen nur sehr unvollkommen gefällt. In seinem Verhalten gegen Salpetersäure und Hitze und auch noch in anderer Beziehung zeigt es nicht die typischen Albumose-Reaktionen, auch enthält es weniger Stickstoff, als die meisten Eiweifsstoffe.

Das Labenzym ist zumeist mit einem Eiweifs vergesellschaftet, dessen Reaktionen es mehr als Hetero-Albumose charakterisieren. Es ist weniger löslich in Wasser und erheischt zur vollkommenen Lösung das Vorhandensein von etwas neutralem Salz. Es wird beim Erhitzen seiner Lösungen vollkommener gefällt, als die beschriebenen Proteo-Albumose.

Die enge Verbindung in beiden Fällen weist auf die Möglichkeit hin, dafs diese Eiweifsstoffe in der That die fraglichen Enzyme sind, doch kann die Identität nicht als erwiesen betrachtet werden.

Lintner stellte Diastase in, wie er meinte, reinem Zustande dar; aus seinen Analysenergebnissen schlofs er, sie sei ein Eiweifsstoff, aber keines der gewöhnlichen Art. Er fand, dafs sie nur zwei Drittel des Stickstoffs und weniger Sauerstoff als Eiweifs enthalte. Auch unterschied sie sich von letzterem noch dadurch, dafs sie die Biuretreaktion nicht lieferte. *Lintner* vermutet hiernach, dafs die Enzyme eine besondere Klasse der Eiweifsstoffe bilden.

Buchner bringt seine neue Zymase mit einem Eiweifsstoff in der Hefe in Beziehung, der bei 45 ° C. koaguliert. Bei dieser Temperatur wird auch die Zymase zerstört. Ist dieses Eiweifs durch die proteolytischen Enzyme der Hefe in dem Prefssaft zerstört, so ist auch die alkoholbildende Kraft verloren. *Buchner* behauptet jedoch nicht, dafs der Eiweifsstoff die Zymase sei.

Keine der bislang aufgeführten Untersuchungen bringt den strikten Beweis für die Eiweifsnatur der Enzyme. Man kann

Digitized by Google

auch alles mit der Annahme erklären, dafs das Enzym auf jeden Fall mit dem Eiweifs eng vergesellschaftet sei. Es wurde schon zu verschiedenen Malen hervorgehoben, dafs die löslichen Enzyme sehr leicht durch Niederschläge, die in den Enzymlösungen erzeugt werden, mit niedergerissen werden. Wenn wir ferner in Betracht ziehen, dafs jedenfalls sehr kleine Mengen derselben sehr grofse Mengen entsprechender anderer Verbindungen umzuwandeln vermögen, so kann man wohl annehmen, dafs eine derartige Vergesellschaftung mit Eiweifs nur sehr schwer mittelst einer Methode der abbauenden Analyse nachzuweisen ist. Gleichzeitig ist es nicht unmöglich, dafs sie Eiweifsstoffe sind, die man noch nicht hat isolieren können, da die vorhandene sehr kleine Menge in dem Gemisch mit anderen Eiweifsstoffen sehr wohl der Isolierung entgehen kann.

Man kann nur sehr schwer der Annahme Glauben schenken, sie seien in der That die Eiweifsstoffe, die mit der enzymatischen Wirksamkeit ausgestattet sind. In vielen Fällen kann man diese frei von jeglichem Fermentativ-Vermögen darstellen.

Die Verschiedenartigkeit der Eiweifsstoffe, in deren Gesellschaft sie gefunden wurden, spricht noch stärker gegen diese Ansicht. Nach *Osborne* ist die Diastase mit einem bestimmten Eiweifsstoffe, dem Leukosin, vergesellschaftet, weniger mit einer Albumose. *Chittendens* Enzyme kommen neben einer Proteo-Albumose und einer Hetero-Albumose vor. *Halliburton* und *Pekelharing* bringen die Thrombase mit einem Körper in Verbindung, der anfänglich für ein Globulin, jetzt aber allgemein als ein Nucleo-Albumin betrachtet wird. Viele Forscher haben andere Enzyme mit koagulierbaren Eiweifsstoffen in Beziehung gebracht, wofür die Thatsache sprechen sollte, dafs die enzymatische Kraft bei der Temperatur, bei der das Eiweifs koaguliert, verloren geht, oder wenn der Eiweifsstoff auf andere Weise ausgefällt wird.

Alles in allem erscheint es unwahrscheinlich, dafs einige Enzyme zu dieser, andere Enzyme zu einer anderen Eiweifsgruppe gehören sollen. Es ist viel eher wahrscheinlich, dafs sie in ihrer Zusammensetzung übereinstimmen und dafs sie, wie *Lintner* annimmt, eine besondere Klasse für sich bilden.

Die Beziehung zwischen dem Verlust der enzymatischen Kraft und der Koagulation durch Wärme kann im Falle der

Digitized by Google

Albumosen nicht aufrecht erhalten werden, denn diese werden selbst bei der Siedetemperatur des Wassers nicht koaguliert. Wir haben keinen Grund zu der Annahme, dafs eine Albumose sich durch Erhitzen auf den Kochpunkt des Wassers, wodurch das Enzym zerstört wird, verändert.

Auch *Osborne's* Identifizierung der Diastase der Getreidearten mit dem Leukosin ist ganz und gar nicht einwandfrei. Leukosin ist ein nur weniger häufig vorkommender Eiweifsstoff, und viele Gewebe, die diastatische Auszüge liefern, enthalten kein Leukosin. Das Leukosin kann demnach nur eine bestimmte Art von Diastase repräsentieren, und da mehrere Diastasen existieren, so mufs es auch noch andere diastatische Eiweifsstoffe geben, wenn das Enzym Eiweifskonstitution besitzen soll. Wenn wir die weite Verbreitung des Enzyms in Betracht ziehen, daneben die sehr verschiedene und wechselnde Zusammensetzung der Eiweifsstoffe verschiedener Pflanzen, so zwingt uns diese Ansicht fast zu dem Schlufs, dafs die Diastase keineswegs von konstanter Zusammensetzung ist, eine Ansicht, die nur schwerlich Annahme finden dürfte.

Aus *Osborne's* Versuchen geht hervor, dafs kein zufriedenstellendes Verhältnis zwischen der Menge des koagulierbaren Eiweifses und der diastatischen Kraft besteht; obwohl letztere gröfser ist, je mehr Eiweifs vorhanden ist, so besteht doch keine zahlenmäfsige Beziehung zwischen beiden. Das wäre kaum der Fall, wenn das Leukosin die Diastase selbst wäre.

Der mangelhafte Zusammenhang zwischen der Menge an Eiweifs und der diastatischen Kraft springt beim Vergleich von Malzauszug mit Speichel sehr in die Augen. Letzterer ist bezüglich der Stärkehydrolyse der wirksamere, ersterer enthält aber viel mehr Eiweifs. Der Unterschied im Verhalten beider Flüssigkeiten entspricht nicht dem Unterschied in der Zusammensetzung, wenn wir nicht annehmen, dafs die hydrolytische Kraft in einem derartigen Gemisch sehr wechselt, was nicht wahrscheinlich ist.

Andere Forscher machten auch die Beobachtung, dafs die Fermentativkraft, zumal in schwachen Auszügen, nicht direkt sich ändert mit dem Gehalt an Eiweifs. Der Verfasser untersuchte diesen Punkt sorgfältig im Falle des pflanzlichen Labenzyms aus dem Ricinussamen. Es wurde ein bestimmter Gehalt

Digitized by Google

an Eiweifs durch Verdünnen eines Normalauszuges hergestellt; der Versuch zeigte, dafs das Milch-Gerinnungsvermögen viel schneller abnahm als der Gehalt an Eiweifsstoffen. Bei einem besonderen Versuch ergab sich, dafs 0,5 ccm eines Auszugs 5 ccm Milch in 4 Minuten zur Gerinnung brachten, während 0,25 ccm dazu 81 Minuten und 0,125 ccm $5^1/_2$ Stunde brauchten.

Reychlers Versuche sollten darauf hindeuten, dafs das Eiweifs entweder der Vorläufer der Diastase oder das Enzym selbst sei. Er erhielt bei der Behandlung des Mehlklebers mit verdünnter Säure eine Lösung, die Stärke verzuckerte. Seine Versuchsergebnisse lassen sich aber auch ebenso gut in anderer Weise deuten. Seine verdünnte Säure extrahierte etwas von der aus dem Endosperm herrührenden Diastase aus dem Mehl, oder aber das Gluten war mit etwas Zymogen vermischt, welches bei der Behandlung mit verdünnter Säure in das Enzym überging.

Jüngst wollte *Wroblewski* nachgewiesen haben, dafs die Diastase eiweifsartiger Natur sei. Bei ihrer Darstellung fand er, dafs der gröfste Teil seines Präparates aus einem Kohlenhydrat bestand, das beim Kochen mit Säuren Arabinose lieferte. Nachdem dieses entfernt war, wies der wirksame Bestandteil alle Eigenschaften eines Eiweifses auf.

Wie bereits gesagt, kann man bei derartigen Untersuchungen auf die Analysen angeblich reiner Produkte nur sehr wenig Wert legen. Soweit man aber die Analysen heranziehen kann, stützen sie die Eiweifstheorie nicht in zufriedenstellendem Mafse. Man kann kaum annehmen, dafs der analysierte Körper wirklich die Diastase selbst gewesen sei.

Das reinste Trypsin, das *Kühne* darstellen konnte, hatte folgende Zusammensetzung:

Kohlenstoff	47,22—48,09
Wasserstoff	7,15— 7,44
Stickstoff	12,59—13,41
Sauerstoff	31,31—29,20
Schwefel	1,73— 1,86

Diese Zahlen weichen von denen des Eiweifses besonders im Prozentgehalt des Kohlenstoffes und des Stickstoffes ab; *Henningers* Pepton enthielt 52,28 % Kohlenstoff und 16,30 % Stickstoff.

Digitized by Google

Nach *Würtz* und *Bouchut* stimmt das Papaïn viel besser mit den Eiweifsstoffen überein; es enthält 52,48 % Kohlenstoff und 16,59 % Stickstoff.

Loew kam zu dem Schlufs, dafs Malzdiastase und die Diastase und das Trypsin des Pankreas in ihrer Zusammensetzung mit der der Eiweifsstoffe sehr nahe übereinstimmen. Andererseits enthielt *Lintners* reinste Diastase nur 9,9 % Stickstoff.

Mit Recht wird man den auf Grund dieser quantitativen Analysen aufgestellten Behauptungen widersprechen, zumal im Hinblick auf die Veränderungen, die die Enzyme bei ihrer Reindarstellung erleiden.

Brücke giebt an, dafs ein nach der auf Seite 178 beschriebenen Methode dargestelltes Enzym keine der charakteristischen Eiweifsreaktionen gab und nur durch Bleiacetat fällbar war. Es gab bei Zusatz von Tannin nicht die Spur einer Opalescenz, obwohl man mit diesem Reagens noch 1 Teil Eiweifs in 100000 Teilen Lösung nachweisen kann.

Hammarsten giebt an, dafs nach der Reinigung sein Labpräparat die Xanthoproteïnreaktion nicht mehr gab; es wurde von Alkohol, Salpetersäure, Tannin, Jod oder normalem Bleiacetat nicht gefällt, dagegen von Bleiessig.

Dastre wies nach, dafs die Enzyme in Alkohol nicht vollständig unlöslich sind, was sich mit ihrer Natur als koagulierbare Eiweifsstoffe nicht verträgt.

Foster zeigte im Jahre 1867, dafs eine Diastaselösung aus den natürlichen Harnsäureabsätzen mit oder ohne vorheriges Waschen mit Alkohol dargestellt werden kann und dafs diese Lösung keine Eiweifsreaktionen gab.

Ferner sahen wir, dafs andere Enzyme aus dem Harn sich darstellen lassen.

Möglicherweise war in allen diesen Fällen die Enzymmenge zu klein, um die Eiweifsreaktion zu geben, doch grofs genug, um eine gewisse hydrolytische Wirkung auszuüben. Es möge jedoch daran erinnert werden, dafs die Xanthoproteïnreaktion aufserordentlich empfindlich ist.

Einige gewichtige Einwürfe gegen die Ansicht, dafs die Enzyme Eiweifsstoffe sind, gründen sich auf ihre Beeinflussung durch das Licht. Soweit hierüber Untersuchungen vorliegen, so

Digitized by Google

beziehen sich diese ausschiießlich auf die Diastase, die der Verfasser vor einigen Jahren in dieser Hinsicht genau prüfte.

Brown und *Morris* behaupten in ihrer Abhandlung über die Diastase in den Laubblättern, daſs in diesen Organen die Menge der Diastase nach einer Periode heller Belichtung abnimmt. Es ist dies besonders zu bemerken, wenn die am Morgen und Abend gesammelten Blätter vergleichsweise geprüft werden. Letztere sind stets ärmer an Diastase, und die Abnahme steht in bestimmter Beziehung zur Stärke des Sonnenscheins, den die Blätter im Laufe des Tages erhalten haben.

Der Verfasser untersuchte Blätter im lebenden Zustande, die in früher Morgenstunde gesammelt und zur Hälfte mehrere Stunden dem Sonnenschein ausgesetzt, zur anderen Hälfte durch eine Lage schwarzen Papiers beschattet worden waren. Der Sonnenschein übte, wie es sich herausstellte, auf das Enzym eine stark zerstörende Wirkung aus. Ein gleiches war der Fall, wenn ein wässeriger Auszug des Enzyms an Stelle des lebenden Gewebes den Sonnenstrahlen ausgesetzt wurde. Die Diastase des Malzauszuges und Speicheldiastase wurden in ähnlicher Weise beeinfluſst. Zur Abwechselung wurde an Stelle des Sonnenlichtes eine sehr starke elektrische Bogenlampe als Lichtquelle benutzt. Auch in diesem Falle war die Wirkung die gleiche.

Hauptsächlich übten die violetten und ultravioletten Strahlen des Spektrums diese schädigende Wirkung auf die Diastase aus.

So viel man bislang weiſs, sind schädigende Wirkungen des Lichtes auf die Eiweiſsstoffe noch nicht festgestellt worden. Es ist dies auch sehr unwahrscheinlich, denn bei seinen Versuchen konnte der Verfasser feststellen, daſs eine Zugabe von koagulierbarem Eiweiſs zur Diastaselösung eine starke schützende Wirkung ausübte; bis zu einem gewissen Punkte war diese schützende Wirkung proportional der Menge des zugesetzten Eiweiſses.

Auch das verschiedene Verhalten der Enzyme und der Eiweiſsstoffe gegen Alkohol verdient Beachtung. Beläſst man koagulierbare Eiweiſsstoffe längere Zeit in Berührung mit Alkohol, so gehen sie in einen Zustand über, der sich von dem der in der Hitze koagulierten Eiweiſsstoffe fast nicht oder überhaupt nicht unterscheidet. Die Enzyme werden von Alkohol nicht mit derselben Leichtigkeit zerstört als durch Hitze. Wir sahen, daſs

Digitized by Google

als Beweisgrund für die Eiweifsnatur der Enzyme die Thatsache angeführt wurde, dafs die Enzyme bei der Koagulationstemperatur der Eiweifsstoffe zerstört werden. Ist dieser Beweisgrund stichhaltig, und sind die beiden Körper identisch, so müfste die Koagulation des Eiweifses mittelst Alkohol das Enzym zerstören. Es ist dies aber nicht der Fall, oder es vermindert sich die enzymatische Kraft doch nicht ebenso rasch als die Koagulation des Eiweifses stattfindet. Bei vielen der zur Extraktion der Enzyme benutzten Methoden ist es nötig, die Enzyme von den beigemischten beträchtlichen Eiweifsmengen durch wiederholte Fällung des Gemisches mit Alkohol zu trennen; selbst nach längerem Stehen des ausgefällten Niederschlages unter Alkohol kann aus dem Niederschlag noch ein sehr wirksamer Enzymauszug dargestellt werden.

Aus einem in der Hitze koagulierten Eiweifs läfst sich kein Enzym mehr ausziehen. Gerade aus diesem Grunde können wir wegen ihres verschiedenen Verhaltens gegen Alkohol einen Unterschied zwischen beiden machen.

Andererseits kann man diesen Beweisgrund auch wieder zu weit treiben. Einige Eiweifsstoffe, z. B. Peptone und gewisse Albumosen werden durch Alkohol ebensowenig wie durch Hitze koaguliert. Wären die Enzyme zu diesen Gruppen gehörige Eiweifsstoffe, dann dürfte sie der Alkohol nicht zerstören. Die Wirkung des Alkohols kann jedoch zum Beweis der Annahme dienen, dafs die Enzyme nicht zu den koagulierbaren Eiweifsstoffen gehören.

Obwohl die Enzyme der Wirkung des Alkohols lange widerstehen, so zerstört sie dieser doch unter Umständen. Sie verhalten sich gegen Alkohol in verschiedenem Grade widerstandsfähig; einige werden in wenigen Stunden zerstört, andere widerstehen der Zersetzung monatelang.

Eine sehr sorgfältige Untersuchung über die Zusammensetzung, Eigenschaften und Reaktionen der Invertase führten *O'Sullivan* und *Tompson* im Jahre 1889 durch. Sie gewannen die Invertase aus einem Hefesaft, den sie darstellten, indem sie die Hefe einige Wochen bei einer Temperatur von 20° C. stehen liefsen und dann filtrierten.

Zu diesem Hefensaft setzte man 70 prozentigen Alkohol ganz langsam und in gewissen Pausen. Sobald ein Niederschlag auf-

Digitized by Google

trat, liefs man die Flüssigkeit zwei Stunden stehen, dann fügte man weitere Alkoholmengen hinzu und so fort, bis kein Niederschlag mehr gebildet wurde. Die Flüssigkeit enthielt alsdann 47 % Alkohol. Der so erhaltene Niederschlag war sehr fein verteilt und enthielt nur sehr wenig Verunreinigungen. Die Flüssigkeit beliefs man zwei Tage über dem Niederschlag, dann gofs man erstere ab und wusch den Niederschlag mit 47 prozentigem Alkohol aus. Dann wurde er auf ein Filter geworfen und weiter mit Alkohol ausgewaschen. Der gewaschene Niederschlag wurde dann in einen Becher verbracht und Wasser in der Menge der ursprünglichen Hefenflüssigkeit zugesetzt. Ein Teil des Niederschlags blieb unlöslich und bestand aus einem besonderen Eiweifsstoff, den die Verfasser Hefeneiweifs nannten. Die Invertase ging in Lösung, und die Lösung besafs ein Inversionsvermögen, das nur um ein weniges geringer war als das der ursprünglichen Hefe. Die Verfasser hielten ihre Invertase für nahezu rein und bestimmten den Verlust während der Darstellung zu etwa 12 %; die Verunreinigungen hielten sie ausschliefslich für die eigenen Zersetzungsprodukte. Sie enthielt eine gewisse Menge Asche, die hauptsächlich aus einem Gemenge von Magnesium- und Kaliumphosphat bestand. Die Asche konnte von der Invertase mittelst Dialyse getrennt werden; die Verfasser waren der Ansicht, dafs sie kein wesentlicher Bestandteil des Enzyms sei. Sie scheinen die Asche jedoch nicht vollständig entfernt, sondern nur auf eine Menge von 0,45 % der Trockensubstanz reduziert zu haben.

Auf diese Weise dargestellt und gereinigt, stellte die Invertase eine weifse, in Wasser sich zu einer klaren, etwas zähen Flüssigkeit lösende Substanz dar, deren Lösung beim Kochen sich nicht trübte. Sie war in Alkohol vom spezifischen Gewicht 0,94 unlöslich und konnte dadurch aus ihren Lösungen gefällt werden. Die Invertase wurde in einem gewissen Grade durch die Fällung zerstört und dies um so mehr, je reiner sie war. Beim Stehen unter Alkohol verlor sie bald ihre enzymatische Kraft. In ganz reinem Zustande konnten die Lösungen nicht ohne Zerstörung des Enzyms mit Alkohol gefällt werden.

Die Invertase gab mit *Millons* Reagens in der Kälte keine Färbung, beim Erhitzen entwickelte sich jedoch eine schwach

Digitized by Google

rötliche Farbe. Die Lösung des Enzyms besafs ein Drehvermögen $[\alpha]_j = +80^{\circ}$. Die Elementaranalyse ergab 46,41 % Kohlenstoff, 6,63 % Wasserstoff und nur 3,69 % Stickstoff. In letzterer Beziehung wich sie sehr von den Eiweifsstoffen ab.

Bei der Prüfung des auf diese Weise aus der Hefe erhaltenen Enzyms ergab es sich, dafs es bei einer fortgesetzten Zersetzung die durch Behandeln mit Alkohol und Säure eintritt, eine Reihe von Körpern bildet, die die Verfasser als Invertan-Reihe bezeichneten. Sie stellten dar und untersuchten sieben Glieder dieser Reihe und beschrieben deren Eigenschaften unter den Bezeichnungen α-, β-, γ-, δ-, ε-, ζ- und η-Invertan; die Invertase selbst ist das zweite Glied dieser Reihe.

Die beiden Endglieder dieser Reihe, das α- und η-Invertan, waren sehr beständige Körper, die Zwischenkörper neigten aber sehr zu spontanen Zersetzungen. Dabei bildeten sich aber stets α-Invertan und die Glieder der Reihe unterhalb des zersetzten Invertans. α-Invertan selbst lieferte bei der Zersetzung ζ-Invertan und Hefeneiweifs. Aufser dem α-Invertan war jedes folgende Glied der Reihe beständiger als das vorhergehende.

Alle Glieder dieser Reihe krystallisierten nicht, waren nicht dialysierbar und farblos; α-Invertan war unlöslich in Wasser, die anderen aber lösten sich leicht zu klaren, aber zähen Lösungen, die beim Kochen nicht trüb wurden. Alkalische oder neutrale Lösungen wurden durch allmähliche Zugabe von Alkohol in eine milchähnliche Flüssigkeit verwandelt, die beim Filtrieren nicht klar wurde, aus der jedoch auf Zusatz einer Säure rasch ein Niederschlag ausfiel. Das α-Invertan wurde in flockigen Massen gefällt, die anderen Glieder schieden sich in Form schwerer, durchscheinender Sirupe aus.

Ihre Zusammensetzung, soweit diese den Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehalt betrifft, zeigt nachstehende Tabelle; zum Vergleich ist die Zusammensetzung des Hefeneiweifses des ursprünglichen Hefensaftes mit aufgeführt.

Substanz	Zusammensetzung der aschefreien Substanz		
	C	H	N
Hefeneiweifs	54,06	7,35	14,53
α-Invertan	48,03	6,65	8,35

Digitized by Google

Substanz	Zusammensetzung der aschefreien Substanz C	H	N
β-Invertan (Invertase)	46,41	6,63	3,69
γ- „	45,62	6,55	3,15
δ- „	46,50	6,82	2,43
ε- „	44,45	6,36	2,07
ζ- „	44,73	6,40	1,61
η- „	—	—	1,05

Aus diesen Analysenergebnissen schlossen die Verfasser, dafs die ersten sechs Glieder der Reihe Verbindungen von Hefeneiweifs mit dem niedrigsten Glied, dem η-Invertan, seien, und dafs letzteres wahrscheinlich eine Verbindung desselben Eiweifsstoffes mit einem Kohlehydrat sei. Letzteres isolierten sie nicht, aber aus den Analysen berechneten sie dafür 43,22 % Kohlenstoff und 6,28 % Wasserstoff.

Indem sie diese Hypothese weiter ausbauten, fanden sie, dafs das niedrigste Glied der Reihe, das η-Invertan, 18 Gewichtsteile dieses Kohlenhydrates auf 1 Gewichtsteil Eiweifs enthielt, dafs ferner das höchste Glied, α-Invertan, 3 Teile Kohlenhydrat auf 4 Teile Eiweifs enthielt. Die anderen Glieder der Reihe wurden nach ihrer Ansicht durch Verbindung dieser beiden Körper gebildet, gemäfs der allgemeinen Formel $\eta + \alpha_n$, worin η dreimal η-Invertan und α das α-Invertan repräsentiert. Die Invertase ist hiernach $\eta\alpha_5$; sie spaltet sich in α- und γ-Invertan nach der Gleichung $\eta\alpha_5 = \eta\alpha_4 + \alpha$; $\eta\alpha_4$ ist aber γ-Invertan, das weiterhin durch Elimination von α in $\eta\alpha_3$ oder δ-Invertan verwandelt werden kann.

Nach dieser Auffassung über die Zusammensetzung der Invertase ist diese kein Eiweifsstoff, sie mufs aber, da sie in ihrem Molekül Eiweifsgruppen enthält, die Eiweifsreaktionen geben. Beim Kochen mit *Millons* Reagens färbt sie sich fleischfarben, auch verbindet sie sich mit Kupfersalzen. Letztere Eigenschaft, die auch die Eiweifsstoffe besitzen, weisen auch die übrigen Glieder der Invertanreihe mit Ausnahme des α-Körpers auf. Es können also mehrere derartiger Kupferverbindungen gebildet werden, die ähnlich aussehen, aber einen verschiedenen Gehalt an Kupfer haben.

Digitized by Google

Mehrere Forscher haben neuerdings die Ansicht ausgesprochen, dafs die Enzyme Nucleo-Albumin sind. Dies hat z. B. *Halliburton* mit Bezug auf die Thrombase behauptet; wie bereits erwähnt, vergesellschaftete er dieses Enzym mit einem Körper, den er „Zellglobulin β" nannte und den er aus lymphoiden Zellen und Geweben darstellte, z. B. aus den Lymphdrüsen und der Milchdrüse. Er extrahierte ihn später aus den Stromata der roten Blutkörperchen. Wurde dieser Körper mit künstlichem Magensaft verdaut, so hinterblieb ein unlöslicher Rückstand von Nucleïn. *Pekelharing* kam bezüglich des Nucleïns in der Thrombase zu dem gleichen Schlufs wie *Halliburton*, er vermutet aber, dafs das Nucleo-Albumin das Zymogen des Enzyms und dafs letzteres eine Kalkverbindung des Nucleo-Albumins ist. *Pekelharing* giebt an, dafs er aus dem Nucleo-Albumin nach der *Schmidt*schen Methode Thrombase erhalten hat. Sowohl er, als auch *Halliburton* wiesen nach, dafs das aus Serum nach *Schmidts* Methode dargestellte Enzym bei der künstlichen Magenverdauung ein Rückstand von Nuclein hinterläfst und dafs es bei der Analyse über 1 % Phosphor enthält.

Pekelharing fand, dafs sein gereinigtes Pepsin ebenfalls Phosphor enthielt, wenn es nach der in einem früheren Kapitel angegebenen Methode dargestellt und durch Dialyse von den Verunreinigungen getrennt wurde; er sprach die Ansicht aus, dafs dieses auch ein Nucleo-Albumin sei. Auch *O'Sullivan* und *Tompson* fanden bei ihren Untersuchungen über Invertase, dafs die Asche des Präparates Phosphor enthielt. Desgleichen giebt *Lintner* an, dafs selbst das reinste Diastasepräparat, das er darstellen konnte, eine beträchtliche Menge Phosphorsäure in der Asche enthielt.

Diese Hypothese wird wesentlich unterstützt durch die Beobachtung von *Macallum*, die bereits in einem früheren Kapitel erwähnt wurde. Hiernach beginnt der Nucleus den Ausscheidungsprozefs und scheidet einen Stoff in das Cytoplasma aus, der dort weiteren Veränderungen unterliegt und schliefslich in das Molekül des Zymogens selbst eintritt, wenn er nicht in Wirklichkeit den Hauptanteil desselben ausmacht. Die Quelle dieses ausgeschiedenen Materiales ist das Chromatin des Zellkernes. *Macallum* hat gezeigt, in wie innigem Zusammenhang der Phosphor mit dem

Digitized by Google

Zymogen steht, von seinem Eintritt in den Zellkern bis zur Zeit, wo die Körnchen völlig ausgebildet sind.

Der Hauptbestandteil des Zellkern-Chromatins scheint ein Nucleo-Albumin zu sein. Möglicherweise besteht das ausgeschiedene Material aus derselben Substanz, und ebenso ist es denkbar, dafs die Veränderungen, denen sie im Cytoplasma unterliegt, ihre Zusammensetzung nicht wesentlich beeinflufst. Sie kann sich dort mit Eiweifsstoffen der verschiedensten Art vergesellschaften, die neben ihm in den Körnchen vorkommen, denn es ist nicht bewiesen, dafs diese allein das Zymogen ausmachen. Thatsächlich scheint ihre Gröfse und Reichlichkeit zu dem Schlufs zu berechtigen, dafs sie Gemenge verschiedener Substanzen sind. In den pankreatischen Zellen mögen die Körnchen in der That mehr als ein Zymogen enthalten, wenn wir auch zur Zeit nicht in der Lage sind, die Richtigkeit dieser Vermutung zu beweisen.

Nach den Untersuchungen von *Jacobson* besitzen mehrere Enzyme aufser ihren spezifischen Eigenschaften noch die Eigenschaft, Sauerstoff aus Wasserstoffsuperoxyd frei zu machen. Von diesen seien besonders erwähnt Diastase, Emulsin und die Enzyme des Pankreas. Viele Organe und Gewebe des Körpers besitzen die gleiche Eigenschaft.

Diese Organe vermögen auch Salicyl-Aldehyd in Salicylsäure zu verwandeln; je nach dem Grad ihrer Wirksamkeit kann man folgende Reihe aufstellen: Blut, Milz, Leber, Pankreas, Milchdrüse, Hirn, Muskel, Eierstock, Eileiter. Wir sahen bereits, dafs das Blut und gewisse andere Gewebe eine Oxydase enthalten, die Zucker zu zerstören vermag.

Spitzer hat neuerlich diese tierischen Flüssigkeiten und Gewebe untersucht und gefunden, dafs die in Rede stehende Eigenschaft den Nucleo-Albuminen eigentümlich ist. Er stellte sie aus mehreren Organen nach einer von verschiedenen Forschern angenommenen Methode dar und überzeugte sich, dafs sie die oxydierenden Eigenschaften des Gewebes selbst besafsen.

Spitzer kam zu dem Schlufs, dafs alle diese Nucleo-Albumine ebenso wie Phosphor, so auch Eisen enthalten; seine Ergebnisse stimmen in dieser Beziehung mit den Beobachtungen von *Macallum* überein. Diese Versuche unterstützen die Ansicht, dafs die Enzyme Glieder der Nucleo-Albumingruppe sind.

Digitized by Google

Die Hypothese von der Nucleo-Albumin-Natur der Enzyme läuft den im ersten Teil dieses Kapitels vorgebrachten Betrachtungen nicht zuwider. In der That erklärt sie manches, was die Annahme erschwert, sie seien einfache Eiweifsstoffe. Ist diese Hypothese richtig, dann kann uns bei der Ähnlichkeit mit der letztgenannten Gruppe von Körpern ihre enge Vergesellschaftung mit den Eiweifsstoffen nicht mehr in Erstaunen setzen, ebenso die Mannigfaltigkeit der Eiweifsstoffe, mit denen vergesellschaftet sie gefunden wurden. Die Unterschiede zwischen der Masse eines bestimmten Enzyms und seiner zymolytischen Kraft erklären sich, wenn nur eine Spur des Nucleo-Albumins mit einer viel gröfseren Menge des begleitenden Eiweifses vergesellschaftet ist.

Eine Beobachtung von *Pekelharing* spricht allerdings gegen diese Annahme über die Konstitution der Enzyme. Er giebt an, dafs die Nucleo-Albumine in verdünnten Säuren unlöslich sind und aus ihren Lösungen durch schwaches Ansäuern leicht ausgefällt werden können. Das ist sicherlich bei vielen proteolytischen Enzymen nicht der Fall, weder beim Speichel noch bei anderen diastatischen Präparaten.

Digitized by Google

Kapitel XXIV.

Die Wirkungsweise der Enzyme. Theorieen der Enzymwirkung.

Bevor wir in eine Besprechung der Ansichten über die Wirkungsweise der Enzyme eintreten, wird es angebracht sein, die Wege zu betrachten, auf denen man zu diesen Ansichten gelangt ist, und die Theorieen zu überblicken, die zu verschiedenen Zeiten zur Erklärung der Fermentationserscheinungen aufgestellt wurden.

Wie wir sahen, ist es erst den letzten Jahren vorbehalten gewesen, für diesen Prozefs eine allgemeine Erklärung an Stelle der bedingten zu geben. Die alten Schriftsteller begrenzten den Begriff der Fermentation oder Gärung im allgemeinen nur auf die alkoholische Gärung, oder doch auf solche Prozesse, die unter Entwickelung eines Gasstromes verlaufen. Den Fäulnisprozefs hielt man diesen Prozessen verwandt, doch gründete sich dieser Zusammenhang nur auf allgemeine Beziehungen und nahm keinen Bezug auf die Thatsache, dafs bei beiden Prozessen organische oder lebende Körper eine führende Rolle spielen. Die früheren Theorieen der Gärung suchten demgemäfs nur eine Erklärung der Erscheinungen, die sich bei gleichzeitiger Bildung von Alkohol der Beobachtung darboten.

Die Litteratur über den vorliegenden Gegenstand ist schon sehr alt; von Fermenten wird häufig gesprochen, doch haben wir nur sehr wenige Anhaltspunkte dafür, was die Autoren unter dieser Bezeichnung verstanden. *Basilius Valentinus*, ein deutscher Alchemist, übermittelt uns die zu Beginn des 15. Jahrhunderts landläufige Ansicht. Nach seiner Meinung existiert der Alkohol bereits vor der Gärung in der Würze oder im Extrakt gekeimter Gerste; er wird gebunden durch verschiedene Verunreinigungen, die seine besonderen Eigenschaften verdecken.

Digitized by Google

Die Gärung ist ein Reinigungsprozefs, bei welchem die Hefe oder das Ferment, deren Natur unbekannt war, die Flüssigkeit in eine innerliche Hitze und in Aufruhr versetzt, wodurch die ursprünglich trübe und nufsfarbige Flüssigkeit so verbessert und von ihren Verunreinigungen befreit wird, dafs der Alkohol nunmehr mit seinen wahren Eigenschaften zu Tage treten kann. Das grofse Hefenwachstum, das mit dem Prozefs verbunden war und nach beendeter Gärung sich am Boden des Gefäfses ablagerte, dachte man sich durch die Verunreinigungen entstanden; einige Autoren schreiben von faeces vini, oder den Exkrementen der Gärflüssigkeit.

Libavius meinte am Ende des 16. Jahrhunderts, das Ferment sei ein Körper, der die vergärende Substanz in einen Körper von ähnlicher Natur wie es selbst verwandele; als Hauptagens bei der Umwandlung betrachtete er die Hitze oder Energie des Fermentes.

Einen Unterschied zwischen Gärung (Fermentation) und Aufbrausen (Effervescenz), die eine Zeitlang für die nämliche Erscheinung gehalten wurden, machte zuerst *de la Boë*, der feststellte, dafs im ersten Falle Zersetzung, im zweiten Falle eine Vereinigung von statten gehe.

Lemery war der viel weniger zutreffenden Ansicht, dafs der Hauptunterschied zwischen den beiden Vorgängen nur in der relativen Geschwindigkeit liege, mit der beide verlaufen; die Gärung verlaufe langsamer und sei ein komplizierterer Vorgang als die Effervescenz. Er meinte, der bei der alkoholischen Gärung gebildete Weingeist sei ein Öl, das durch die essentiellen Salze des Weinmostes geläutert werde. Der den Prozefs begleitende Hefenbodensatz bestehe aus den gröberen Bestandteilen des Mostes, die durch die Wirkung der Salze ausgeschieden würden und dabei teils die Form eines Bodensatzes, teils die eines auf der Oberfläche schwimmenden Schaumes annähmen.

Eine vernünftige Ansicht über die Gärwirkung tauchte erst später auf, als *Willis* im Jahre 1659 und *Stahl* 40 Jahre später zum erstenmale eine physikalische Hypothese aufstellten. Sie meinten, das Ferment sei ein Körper, der eine innere Bewegung besitze, die er auf das vergärbare Material übertrage. *Stahl* dehnte diese Ansicht auch auf die Fäulnis aus und meinte, die

Digitized by Google

alkoholische Gärung sei ein besonderer Fall der Fäulnis; nach seiner Ansicht besteht jede vergärbare Substanz aus Teilchen, gebildet aus einer losen Verbindung von Salz, Erde und Öl; unter dem Einflufs der inneren Bewegung des Fermentes trennen sich die verschiedenen Bestandteile von einander und vereinigen sich wieder in verschiedener Weise, wobei sie allmählich Körper von grofser Beständigkeit bilden, die zwar dieselben Bestandteile, jedoch in verschiedenem Mengenverhältnis enthalten.

Der Gedanke einer physikalischen Bewegung oder Vibration bedeutet einen grofsen Fortschritt gegen die früheren Theorieen und hat bei späteren Spekulationen, die sich auf genaue chemische Erkenntnisse stützten, eine Hauptrolle gespielt. Er behauptete seinen Platz bis zum Beginn des laufenden Jahrhunderts.

Im Jahre 1810 sprach *Gay-Lussac* die Ansicht aus, dafs im Weinmost und anderen zuckerhaltigen Flüssigkeiten die Gärung durch die Gegenwart von Sauerstoff eingeleitet werde. Er hielt es nicht für nötig, dafs während des ganzen Prozesses Sauerstoff vorhanden sei, sondern meinte, der Prozefs könne ohne Sauerstoff nicht beginnen.

Ums Jahr 1837 trat an die Stelle der physikalischen Auffassung von der Gärung die vitalistische Theorie von *Cagniard de Latour*, die sich auf die Entdeckung der wahren Natur der Hefe gründete, eine Entdeckung, die ungefähr zur gleichen Zeit unabhängig von einander *Schwann* in Jena und *Kützing* in Berlin machten. Er fand, dafs die Hefezellen Kohlensäuregas entwickelten und Alkohol bildeten vermöge ihres eigenen Lebensprozesses. Derselbe Gedanke war schon 20 Jahre früher *Erxleben* unterlaufen, doch legte er darauf in seinen Schriften kein Gewicht.

Auch *Astier* deutete bereits im Jahre 1813 die vitalistische Theorie an. Obwohl er die Fermentkügelchen tierischer Natur hielt, so meinte er doch, sie erneuerten und nährten sich auf Kosten des Zuckers und gäben den Anstofs zu einer Gleichgewichtsstörung der elementaren Bestandteile dieses Körpers.

Schwanns Ansichten, die gleichzeitig mit denen *de Latours* bekannt wurden, fafst *Lafar* (Technische Mykologie, S. 16) in folgenden Worten zusammen: Die weinige Gärung wird man sich demnach vorstellen müssen als diejenige Zersetzung, welche dadurch hervorgebracht wird, dafs der Zuckerpilz dem Zucker und einem

Digitized by Google

stickstoffhaltigen Körper die zu seiner Ernährung und zu seinem Wachstum notwendigen Stoffe entzieht, wobei die nicht in die Pflanze übergehenden Elemente dieser Körper (wahrscheinlich neben anderen Stoffen) vorzugsweise sich zu Alkohol verbinden.

Kützing, dessen Name ebenfalls mit der Erforschung der Natur der Hefe und der darauffolgenden Theorie ihrer Wirkung verknüpft ist, entdeckte die Natur des Organismus, der aus Alkohol Essig bildet; bei der Veröffentlichung seiner Forschungen stellte er die beiden Gärungen nebeneinander. *Lafar* giebt aus seinen Schriften folgende Stellen wieder: „Es ist bekannt, dafs die Chemie die weinige Gärung durch die Einwirkung des sogenannten Klebers auf das Amylon und den Zucker erklärt; ich mufs aufrichtig gestehen, dafs ich mir durch diese Erklärung den Vorgang nicht deutlich machen kann. Ob andere darin glücklicher sind, möchte ich bezweifeln. Aber sicher hängt der ganze Prozefs bei der geistigen Gärung von der Bildung der Hefe und bei der sauren von der Bildung der Essigmutter ab ... Mit dem gröfseren Anwuchse dieser Organismen vermehrt sich auch der Vervielfältigungstrieb und mit diesem nimmt zugleich die Einwirkung auf die vorhandene Flüssigkeit zu ... Insofern nun Gärung gleichbedeutend ist mit einer gegenseitigen Wirkung sich erzeugender organischer und anorganischer Gebilde auf die Bestandteile einer gegebenen Flüssigkeit, die in Bezug auf das organische Produkt als Nahrungsmittel betrachtet werden kann, so ist sie auch notwendig gleichbedeutend mit jedem organischen Lebensprozefs. Daher organisches Leben — Gärung. Jene Prozesse dagegen, welche die Essigbildung aus Alkohol mittelst Platinmohr, oder auf andere, diesem ähnliche Weise einleiten, können nicht mit der Gärung verglichen werden, sie sind rein-chemische Prozesse, während die Gärung ein organisch-chemischer Prozefs, wie der Lebensprozefs eines jeden organischen Körpers, ist.

Die Vertreter der älteren Theorie bekämpften die neue Theorie sehr heftig. *Liebig*, der Hauptkämpe für die physikalische oder physiko-chemische Hypothese, modifizierte die *Stahl*schen Behauptungen etwas, indem er sie in Einklang brachte mit den Entdeckungen, die inzwischen auf dem Gebiete der Chemie gemacht worden waren. Er unterschied schärfer als *Stahl* zwischen Fäulnis und Gärung, wenn er auch zugab, dafs sie vieles gemein-

Digitized by Google

sam haben. Er giebt seine Ansichten wie folgt wieder: „Die Bierhefe und im allgemeinen jede tierische und pflanzliche faulende Substanz überträgt auf andere Körper den Zustand, in dem sie sich selbst befindet; die Vibration, in die durch die Störung ihres Gleichgewichtes ihre eigenen Teilchen versetzt worden sind, überträgt sich in gleicher Weise auf die Teilchen der Körper, mit denen sie in Berührung ist." Der Unterschied zwischen Fäulnis und Gärung besteht nach ihm darin, dafs bei ersterer die Zersetzung durch die sich zersetzende Substanz selbst übertragen werde, so dafs die einmal begonnene Fäulnis durch eigene Bewegung auch dann noch fortdauere, wenn die Ursache, welche dazu den Anstofs gegeben, unwirksam geworden ist. Anders sei es bei der Gärung. Bei dieser könne der in Zersetzung begriffene Körper (Zucker) die Bewegung auf noch unzersetzte Substanz nicht übertragen, dies müsse vielmehr durch eine fremde Ursache geschehen, durch ein Ferment, das somit in diesem Falle nicht blofs zur Einleitung (wie bei der Fäulnis), sondern auch zur Unterhaltung der Zersetzung notwendig sei. Während er jedoch zugab, dafs Hefe für die Durchführung der Gärung unentbehrlich sei, war er jedoch durchaus nicht der Ansicht, dafs ihre Wirkung mit ihrem Wachstum zusammenhänge, wie dies die Vitalisten behaupten. Er betrachtete sie lediglich als Stickstoffquelle, durch deren Zersetzung die Gärung unterhalten wird, ganz ebenso, wie die Fäulnis mit der Zersetzung ähnlichen Eiweifsmaterials im Zusammenhang steht.

Liebigs Ansichten fanden viele Freunde, denn seine Hypothese schien nicht nur der alkoholischen Gärung und der Fäulnis Rechnung zu tragen, sondern auch gewissen anderen Gärungen, für die man bislang keine Erklärung hatte, hauptsächlich der Milchsäure- und Buttersäurebildung aus Zucker. Wenn wir auch jetzt wissen, dafs diese Prozesse das Werk von organischen Lebewesen sind, so war dies zur damaligen Zeit noch nicht erkannt, und die einzige dafür mögliche Erklärung glaubte man in der Wirkung sich zersetzender Stickstoffsubstanzen in den Zuckerlösungen gefunden zu haben. Einige Autoren dieser Schule, darunter *Fremy*, glaubten, dafs der Charakter der einzelnen Gärungen sich nach dem Grad richte, bis zu welchem die Zersetzung des Eiweifses vorgeschritten sei. Zunächst werde die

Digitized by Google

alkoholische Gärung eingeleitet, doch bei weiter fortschreitender Zersetzung trete an deren Stelle die Milchsäure- oder Buttersäuregärung und so weiter.

Die vitalistische Theorie der Gärung, die *de Latour*, *Schwann* und *Kützing* predigten, fand einen Anhänger in *Pasteur*, dessen ausgezeichneter Forschungen bereits Erwähnung gethan wurde. Er führte diese Theorie viel weiter als ihre Begründer; er suchte den Grund dafür, warum das vegetative Leben der Hefe mit einem derartigen völligen Zerfall verknüpft sei. Im Verlauf seiner Untersuchungen festigte er die von ihm eingenommene Stellung sehr durch die Entdeckung, dafs Alkohol und Kohlensäure nicht die einzigen Umwandlungsprodukte des Zuckers sind, sondern dafs etwa 4 % des letzteren anderweitig zersetzt werden, indem Glycerin und Bernsteinsäure gebildet werden. Er zeigte auch, dafs bei der Stoffwechselthätigkeit der Hefe aufser dem gewöhnlichen Alkohol noch andere Alkohole in wechselnden Mengen gebildet werden.

Pasteur zog aus seinen Untersuchungen den Schlufs, dafs die weitgehende Zersetzung des Zuckers der Ausdruck des Bestrebens der Hefe sei, sich mit Sauerstoff zu versorgen; ihm war also die Gärung ein Phänomen der intramolekularen Atmung der Hefe. Wie bereits erwähnt, wurde diese Ansicht gestützt durch die Untersuchungen von *Lechartier* und *Bellamy* über die Alkoholbildung in Früchten, wenn diese in einer Kohlensäure-Atmosphäre gehalten wurden.

Andere spätere Forscher, insbesondere *Schützenberger*, widersprachen der *Pasteur*schen intramolekularen Atmungstheorie und behaupteten, der Zucker sei ein Nährstoff für die Hefe, eine Ansicht, die auch heute noch für zutreffend gehalten wird.

Der Widerstreit zwischen der physikalischen und physiologischen Schule hielt mit Schärfe an. *Liebig* änderte seine Ansichten sehr weitgehend, um sie mit den von *Pasteur* beigebrachten Thatsachen in Einklang zu bringen; doch hielt er noch daran fest, dafs die Gärung im wesentlichen Vibration oder Bewegung innerhalb der Moleküle der gärenden Substanz sei. Doch nahm er an, dafs die Ursache der Vibrationen die lebenden Organismen und nicht die in Zersetzung begriffene organische Substanz sei.

Man bemühte sich, die Meinungen auf der von *Liebig* zuletzt

Digitized by Google

geäufserten Meinung mit einander in Einklang zu bringen. Nach *Pasteur* war der Vorgang hauptsächlich intracellular; die Zersetzungen finden in den Hefenzellen statt, in direkter Verbindung mit deren Stoffwechselprozefs, wobei die Gärungsprodukte von der Zelle als Exkremente abgeschieden werden. Die Vertreter der *Liebig*schen Ansicht behaupteten unter der Annahme, dafs die lebenden Zellen die in Rede stehenden Vibrationen ins Werk setzen, dafs die zersetzenden Kräfte selbst aufserhalb der Hefezelle entständen und die vergärende Flüssigkeit in deren Umgebung angriffen. Der bemerkenswerteste Vertreter dieser Theorie war *Nägeli*, der der Ansicht war, die Gärung sei eine Übertragung der Vibrationen oder Bewegungen von der die lebende Hefezelle bildenden Substanz auf das aufserhalb befindliche Gärmaterial, die lebende Substanz bleibe dabei völlig unverändert. Durch solche übertragene Vibrationen werde das Gleichgewicht der Moleküle der vergärbaren Substanz zerstört, deren Zersetzung die Folge davon ist. *Nägeli* berechnete sogar die Entfernungen, auf die sich diese Bewegungen übertragen lassen und kam zu dem Ergebnis, dafs der Wirkungskreis jeder Zelle sich auf 20—50 $\mu\mu$ im Umkreis erstrecke.

Während dieses Hin- und Herstreitens wurde eine neue Entdeckung, oder vielmehr eine Reihe von Entdeckungen gemacht, deren Wirkung sich bald fühlbar machte und die geeignet waren, die physiologische Hypothese der Vitalisten sehr weitgehend zu modifizieren und auszubauen. Die Arbeiten von *Payen* und *Persoz* im Jahre 1833 und von *Schwann* im Jahre 1836 führten zur Erkennung einer Klasse von Substanzen, die Fermentationen ganz ähnlicher Art wie die alkoholische Gärung der Hefe ins Leben rufen konnten, die in ihrer Wirkung sich sehr ähnlich verhalten, aber nicht von der Gegenwart lebender Organismen abhängig sind. Diese Körper, die wir jetzt unter dem Namen Enzym kennen, stammten alle aus lebenden Zellen; man erkannte sehr bald, dafs ihre Wirkung der der Hefezellen und anderer Organismen, deren man immer mehr kennen lernte, sehr ähnlich sei; man fand, dafs sie wie Fermente wirken; man gab ihnen den Namen unorganisierte Fermente, um einerseits ihre Wirkungsweise anzudeuten, andererseits sie von den lebenden Hefezellen zu unterscheiden.

Digitized by Google

Die gerade im Schwange befindliche Gärungstheorie hatte keinen Raum für diese neuen Körper, und eine Zeitlang gab man sich auch gar keine Mühe, sie mit den landläufigen Ansichten in Einklang zu bringen. Im Gegenteil, man bemühte sich, den Nachweis zu führen, dafs sie, obwohl sie auf den ersten Blick den organisierten Fermenten sehr ähnlich seien, doch von diesen wesentlich verschieden seien. In seiner „Theorie der Gärung", die er im Jahre 1879 veröffentlichte, verweilt *Nägeli* hauptsächlich bei diesem Punkt. Er sagt: Gärung durch Pilze findet nur statt in unmittelbarer Berührung mit dem Protoplasma und im Bereiche seiner molekularen Thätigkeit. Er findet einen Unterscheidungspunkt zwischen den beiden Fermenten in der Thatsache, dafs die Enzyme plastisches Material aus dem passiven in den aktiven Zustand überführen, so dafs es zur Ernährung geeignet wird, während die Produkte der Gärung durch Pilze ohne Ausnahme für die Ernährung wenig geeignet sind und eine derartige Gärung besonders die vorzüglichsten Nährstoffe zersetzt. „Der Gegensatz tritt noch mehr zu Tage bei den Kohlenhydraten und Eiweifsstoffen; während durch die Wirkung der unorganisierten Fermente (Enzyme) aus diesen Zucker und Peptone gebildet werden, werden diese Verbindungen durch die Gärung mittelst Pilzen in Alkohol, Mannit, Milchsäure und in Leucin, Tyrosin u. s. w. zerlegt. In einigen Fällen folgen mehrere Gärungen aufeinander; die Gärprodukte werden dann schrittweise schlechtere Nährstoffe. Allgemein kann man sagen, dafs die Hefenpilze das Medium, in dem sie wachsen, durch jeden Gärvorgang, den sie bewirken, chemisch ungeeigneter für die Ernährung machen."

Sachs unterstützt im Jahre 1882 die Ansichten *Nägelis*. In seinen „Vorlesungen über Pflanzenphysiologie" sagt er: „Bei der Gärung durch unorganisierte Fermente verläuft die chemische Umwandlung glatt und vollkommen; Dextrin wird vollständig in Traubenzucker umgewandelt, Rohrzucker vollständig in Invertzucker, Albuminate in Peptone. Bei der alkoholischen Gärung andererseits, deren Produkte bislang allein quantitativ bestimmt wurden, wird nur der gröfste Teil des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure umgewandelt, während nach *Pasteur* ungefähr 5 % in Glycerin, Bernsteinsäure und Kohlensäure zerlegt werden. Es

Digitized by Google

ist wahrscheinlich zutreffend, dafs bei der Milchsäuregärung nicht aller Zucker in Milchsäure übergeführt wird. Kohlensäure scheint insbesondere ein Produkt aller Gärungen, die durch Pilze und Fäulnisprozesse hervorgerufen werden, zu sein. Der behauptete Unterschied zwischen Gärung durch unorganisierte Fermente und durch Pilzthätigkeit würde unerklärlich sein, wenn beide Prozesse die nämliche Ursache hätten. Jede Schwierigkeit schwindet andererseits, wenn die Gärung durch Pilze nicht durch eine Kontakt-Substanz (Ferment), sondern durch das lebende Plasma bewirkt wird. Wir sehen dann ein, dafs einerseits das Ferment als eine einfache chemische Verbindung eine andere chemische Verbindung in einfacher und gleichförmiger Weise zersetzt, so dafs alle Moleküle die gleiche Art der Zersetzung erleiden, während andererseits eine organisierte Substanz mit ihren zahlreichen molekularen Bewegungen und molekularen Kräften kompliziertere Zersetzungen zu Wege bringt.«

Sowohl *Nägeli* als auch *Sachs* legen Gewicht auf die Thatsache, dafs zur damaligen Zeit Enzyme, die eine Gärung in Abwesenheit der Zellen bewirken konnten, noch nicht aus irgend einem dieser Pilze gewonnen worden waren. *Nägeli* leugnete auch, dafs irgend einer der intracellularen Gärungsvorgänge in irgend einem Organismus, sei es tierischen oder pflanzlichen, auf unorganisierte Fermente zurückzuführen sei und schrieb sie stets der fermentativen Thätigkeit des Protoplasmas zu.

Diese Ansicht fand jedoch fast von Anbeginn an Widerspruch. Im Jahre 1858 begründete *Moritz Traube* auf dem Ursprung und der Wirkung dieser Enzyme eine neue Theorie der Gärung, die durch alle späteren Forschungen Unterstützung fand und deren Richtigkeit immer mehr erkannt wird. Diese Ansicht geht nämlich dahin, dafs jede Gärung nicht durch die Organismen selbst, sondern durch Enzyme, die als Produkte ihrer Lebensthätigkeit gebildet werden, ins Leben gerufen wird, und dafs diese Enzyme entweder von den Organismen in aufserhalb befindliche Substanzen abgeschieden werden, oder in den Zellen zurückgehalten werden, um eine intracellulare Verdauung zuwege zu bringen. Diese Hypothese ist insofern von grofsem Wert, als sie alle Gärerscheinungen auf eine Linie stellt und zeigt, dafs die alkoholische Gärung nicht etwas eigenartiges ist, sondern nur

Digitized by Google

eine Bekundung eines sehr vielfältigen Vermögens. Die Thatsache, dafs alkoholische Gärung von einem aus der Hefe gewonnenen Enzym bewirkt werden kann, spricht durchaus zu Gunsten dieser Theorie, und diese wird auch kräftig unterstützt durch die Extraktion von Enzymen aus so manchen anderen Mikroorganismen.

Berthelot war einer der ersten Chemiker, der sich diese Theorie zu eigen machte, deren Richtigkeit er noch durch die Beobachtung stützen zu können glaubte, dafs in gewissen Fällen Alkoholbildung ohne Vorhandensein von Hefe stattfinden kann. Auf die hierauf bezüglichen Versuche von *Lechartier* und *Bellamy* und von *Pasteur* ist bereits hingewiesen worden. Auch *Hoppe-Seyler* äufserte sich zu Gunsten dieser Theorie, wie wir bereits in einem früheren Kapitel dieses Buches mitgeteilt haben.

Ehe wir zur Betrachtung der Frage zurückkehren, wie weit wir die Wirkung der Enzyme zu erklären imstande sind, ist es angebracht, die Einwände, die *Nägeli* und *Sachs* gegen diese Theorie erhoben, zu betrachten, wobei sie von der Ansicht ausgingen, dafs die Natur der Produkte der enzymatischen Wirkung von der durch die Thätigkeit der unorganisierten Fermente oder Pilze gebildeten so sehr verschieden sei. Die besonderen Erscheinungen, die letztere darbieten, finden sich wieder unter den Stoffwechsel-Erscheinungen anderer Pflanzen aufser den Pilzen und sind in Wirklichkeit der Ausdruck der Lebensthätigkeit der Pflanzen in einem Zustand, der bei den niederen Formen der gewöhnliche ist, der aber auch abnormalerweise bei den höheren sich vorfindet. Wie wir sahen, ist das Hauptmerkmal des Lebens dieser Pflanzen die Thatsache, dafs ihre Stoffwechselprodukte immer mehr für die Ernährung ungeeignet werden, je weiter das Leben, oder wie die Verfasser sagen, die Fermentation vorschreitet. Wenn man in Betracht zieht, dafs die in Rede stehende Gärung der Ausdruck des Bestrebens der Zelle ist, sich aus ihrer Umgebung Nahrung zu verschaffen, so kann dies weniger auffallen, ist im Gegenteil etwas ganz Selbstverständliches. Unter gewissen Bedingungen verhalten sich jedoch die höheren Pflanzen ähnlich; sie müfsten also auch als Fermente angesehen werden, wenn diese Erscheinung ein spezifisches Kennzeichen der Gärung wäre. *Böhm* und *de Luca* zeigten, dafs ein Pflanzenteil, der ungenügend

Digitized by Google

mit Sauerstoff versorgt wird, Wasserstoff und manchmal Sumpfgas entwickelt. *Boussingault* und *Schulz* haben ähnliches beobachtet. Diese Gasentbindungen sind ganz gewöhnliche Erscheinungen der durch Mikroorganismen bewirkten Fäulnis. Mannithaltige Pflanzen geben Wasserstoff ab, während sich nach *de Luca* aus der Apfelsäure in den Früchten, Blüten und Blättern des Hartriegels Essigsäure entwickelt. Bei der Zersetzung der Eiweifsstoffe hinwiederum wird, wie *Böhm* fand, Ammoniak entwickelt. Die Bedingung, unter der sich diese Prozesse abspielen, nämlich die Abwesenheit des Sauerstoffs, ist der Normalzustand vieler Mikroben; sie sind in ihrer Lebensweise anaërob. Bei Gegenwart von Sauerstoff finden wir dieselbe Übereinstimmung. Die Invertase wirkt genau gleich, mag sie nun aus der Hefe, oder aus höheren Pflanzen gewonnen sein. Die von dem Trypsin bewirkte Zersetzung der Eiweifsstoffe in Albumosen, Peptone und Amide gleicht der von manchen proteolytischen Bakterien bewirkten, bei denen man bislang eine Enzymausscheidung noch nicht feststellen konnte. *Sachs* betrachtet die Entwickelung von Kohlensäure als ein besonderes Charakteristikum aller durch Pilze bewirkten Gärungen. Das ist aber nicht weiter verwunderlich, denn die Pilze, wie alle lebenden Wesen, atmen dieses Gas bei ihrem Lebensprozesse aus. Die Menge der ausgeatmeten Kohlensäure kann in vielen Fällen ganz einfach dadurch wesentlich gesteigert werden, dafs man die Pflanze ungenügend mit Sauerstoff versorgt.

Der Unterschied, den man zwischen den beiden sogenannten Klassen von Fermenten machte, hält daher einer sorgfältigen kritischen Prüfung nicht Stand.

Wie die Enzyme eigentlich wirken, ist bislang noch nicht genau festgestellt, und wir werden hierin auch nicht eher weiter kommen, als bis wir genaueres über ihre Natur und Zusammensetzung wissen. Selbst wenn wir annehmen, dafs sie zur Gruppe der Nucleo-Albumine gehören, haben wir weder eine Vorstellung von ihrer chemischen Zusammensetzung noch über die Art und Weise ihrer molekularen Gruppierung. Doch sehen wir klarer in Bezug auf die Art ihrer Wirkung.

Wir sahen bereits, dafs die Wirkung der Enzyme in vielen Fällen eine Hydratation ist, insbesondere bei den einfachsten Umwandlungsprozessen. Wir wollen uns einige dieser Prozesse ins

Digitized by Google

Gedächtnis zurückrufen und sie durch Gleichungen versinnbildlichen:

Invertase: $C_{12} H_{22} O_{11} + H_2 O = C_6 H_{12} O_6 + C_6 H_{12} O_6$.
Emulsin: $C_{20} H_{27} NO_{11} + 2 H_2 O = C_6 H_5 COH + HCN + 2 C_6 H_{12} O_6$.
Lipase: $C_{57} H_{104} O_6 + 3 H_2 O = 3 C_{18} H_{34} O_2 + C_3 H_5 (OH)_3$.
Urease: $CO (NH_2)_2 + 2 H_2O = (NH_4)_2 CO_3$.

Die Oxydasen bewirken einen anderen Vorgang von ähnlichem Charakter, doch statt Hydratation bewirken sie Oxydation. Im Falle der Einwirkung der Laktase auf Hydrochinon stellten wir folgende Gleichung auf:

$$2 C_6 H_4 (OH)_2 + O_2 = 2 H_2 O + 2 C_6 H_4 O_2.$$

Dieses Enzym unterscheidet sich also von denen der anderen Gruppe dadurch, dafs es Sauerstoff anstatt Wasser überträgt.

Diese beiden Reaktionen lassen vermuten, dafs die Enzymwirkung in der Übertragung eines Moleküls Wasser auf den der Wirkung des Enzyms unterworfenen Körper besteht, mit dem es sich sonst nicht verbinden könnte; man könnte auf derartige Beobachtungen eine verhältnismäfsig einfache chemische Hypothese gründen. Es ist jedoch nicht angebracht, die Beobachtungen zu verallgemeinern, denn andere durch Enzyme bewirkten Zersetzungen sind nicht von dieser Art. Man kennt zwei bemerkenswerte Fälle, bei denen die Zersetzung der fermentierenden Substanz scheinbar ohne die Mitwirkung von Wasser oder Sauerstoff vor sich geht. *Buchners* Zymase spaltet Zucker nach der Gleichung:

$$C_6 H_{12} O_6 = 2 CO_2 + 2 C_2 H_6 O,$$

und Myrosin zersetzt das Sinigrin nach der Gleichung:

$$C_{10} H_{18} NKS_2 O_{10} = C_3 H_5 CNS + C_6 H_{12} O_6 + 12 KHSO_4.$$

Wir dürfen jedoch nicht daraus schliefsen, dafs selbst die zuerst angegebenen Gleichungen nur das Endergebnis der Wirkung der in Rede stehenden Enzyme ausdrücken. Wir haben keinen Grund zur Annahme, dafs die Reaktionen so einfacher Natur sind, wie sie die Gleichungen andeuten, im Gegenteil haben wir alle Ursache, das Gegenteil anzunehmen. Wir wissen, dafs die Wirkung der Diastase, die sich durch eine äufserst einfache Gleichung versinnbildlichen läfst, eine progressive ist und in vielen einzelnen Phasen verläuft.

Gewisse Beobachtungen von *O'Sullivan* uud *Tompson* über das Verhalten der Invertase berechtigen zu dem Schlufs, dafs die

Digitized by Google

Hydrolyse des Rohrzuckers durch das Enzym eher ein komplizierter als einfacher Prozefs ist. Bei dem Studium der Wirkung einer Temperaturerhöhung auf das Enzym stellten sie fest, dafs dessen Widerstandskraft gegen Hitze sehr verschieden war. je nach Bedingungen, unter denen man es auf den Rohrzucker einwirken liefs. Wurde es ohne Rohrzucker erhitzt, so wurde das Enzym bei 50° C. fast vollständig zerstört; bei Gegenwart von Zucker trat erst bei einer um 25° C. höheren Temperatur, also bei 75° diese Zerstörung ein. Die Verfasser erklären dies so, dafs die Invertase mit dem Zucker eine Verbindung eingeht als eine Phase der Hydrolyse, und dafs die so gebildete Verbindung der Hitze besser widerstehen kann als die Invertase allein. Sie glauben ferner, dafs die neue Verbindung unbeständig ist und zersetzt wird, wenn ihr Molekül mit einem anderen Zuckermolekül in Berührung kommt.

Mögen wir nun dieser Erklärung zustimmen oder nicht, so müssen wir doch aus diesen Beobachtungen über den Einflufs des Rohrzuckers auf die Zerstörungstemperatur zur Annahme kommen, dafs die Reaktion dadurch kompliziert wird, dafs die Invertase sich daran beteiligt.

Diese Beobachtung steht nicht vereinzelt da. Der Verfasser beobachtete einen ähnlichen Unterschied im Verhalten beim pflanzlichen Labenzym, wenn auch in entgegengesetzter Richtung. Dieses Enzym wird bei Gegenwart von Kaseïn bei niedrigerer Temperatur geschwächt und getötet, als wenn es bei Abwesenheit dieses Eiweifsstoffes ähnlichen Temperatureinflüssen unterliegt.

Buchners Zymase hinwiederum ist bei Vorhandensein von Zucker beständiger als beim Fehlen des Zuckers.

Chittenden beobachtet, dafs beim Erhitzen neutralisierten Ananassaftes, der Bromelin enthält, auf 60° C. bei Abwesenheit von Albumosen oder Peptonen das Enzym schnell zerstört wird, wohingegen es bei dieser Temperatur bei Gegenwart von Eiweifsstoffen am wirksamsten ist.

Biernacki fand in ähnlicher Weise, dafs die Gegenwart von Albumose oder Pepton die Zerstörungstemperatur des Trypsins um 5° und darüber erhöht und dafs Pepsin bei Abwesenheit von Pepton in saurer Lösung bei 55° C. getötet wird, während es bei Gegenwart von Pepton noch bei 70° C. wirksam war.

Digitized by Google

Im Anschlufs hieran sei auch des hindernden Einflusses von Spuren von Säuren oder Alkalien auf die Wirkung der Enzyme Erwähnung gethan. Die sehr kleine Spur des zur Verhinderung der Wirkung erforderlichen Reagens scheint der gewöhnlich sehr kleinen Menge des vorhandenen Enzyms zu entsprechen, und es ist wohl anzunehmen, dafs die Wirkung darin ihren Grund hat, dafs die Säure mit dem Enzym eine Verbindung eingeht und diese mit der Substanz, die das Enzym gewöhnlich zersetzt, nicht in Reaktion treten kann. Dafs Säuren und Enzyme sich in einigen Fällen verbinden, wissen wir aus den Beziehungen zwischen Pepsin und Salzsäure; dieses Enzym ist ohne Salzsäure oder irgend eine andere Säure absolut unwirksam. *Biernacki* zeigte, dafs das Pepsin bei Abwesenheit von Säure bei einer um 5° C. niedrigeren Temperatur zerstört wird als bei Gegenwart von Säure. *Chittenden* fand, dafs Bromelin auf der anderen Seite in neutraler Lösung widerstandsfähiger ist als in saurer Lösung. In diesem Falle ist die Verbindung, wenn diese wirklich besteht, weniger beständig als das Enzym allein.

Wir sehen, dafs die von den Enzymen bewirkten Umwandlungen sehr verschiedenartig sind. In einigen Fällen scheint die Wirkung eine hydrolytische, in anderen eine oxydierende zu sein, während in anderen eine Zersetzung ohne Hydrolyse oder Oxydation vor sich geht.

Will man eine Hypothese aufstellen, die allen diesen Umwandlungen Rechnung tragen soll, so ist es nicht nötig in dieser Hinsicht zu unterscheiden zwischen 1. der enzymatischen Thätigkeit des Plasmas, 2. der Wirkung der Enzyme, die nur intracellular wirken und die nur vorübergehend existieren und bald nach Erfüllung ihres Zweckes zersetzt werden, und 3. der Wirkung solcher, die von den Zellen ausgeschieden werden, die viel beständiger sind und nach verschiedenen, bereits beschriebenen Methoden gewonnen werden können. Der Unterschied zwischen diesen drei Agentien ist wahrscheinlich nur ein Gradunterschied, aber nicht ein Artunterschied.

Es ist jedoch klar, dafs eine zufriedenstellende Hypothese auf eine physikalische oder physiko-chemische Theorie zurückgehen mufs, wenn auch eine derartige Anschauung nicht viel oder gar nichts mit der physiologischen gemein zu haben braucht.

Digitized by Google

Gesetzt den Fall, das Problem sei ein physiologisches, soweit es die Funktionen der Enzyme und ihre Stellung bezüglich des Stoffwechsels des Organismus betrifft, so müssen wir zugestehen, dafs die Veränderungen, die wir Stoffwechsel nennen und an denen diese Enzyme beteiligt sind, im Grunde mit chemischen oder physikalischen Prozessen verknüpft sind, die sich in der Zelle abspielen.

Wir können uns jetzt nicht mehr mit der Behauptung zufrieden geben, die Gärung sei mit dem Leben des Organismus verknüpft und sei eine Lebensäufserung derselben. Wir müssen weiter gehen und die Natur des Prozesses erforschen, durch den sie zur Erhaltung dieses Lebens beiträgt und am Stoffwechsel beteiligt ist. Eine derartige chemische oder physikalische Hypothese hat sehr wenig gemein mit der *Liebig*schen, aufser vielleicht die Ansicht, dafs molekulare Vibration bei der Umwandlung eine Rolle spielt, wenn in der That eine auf Vibration aufgebaute Hypothese einer Prüfung überhaupt standhält.

Ehe wir in die Diskussion der Frage eintreten, inwieweit sich der physikalische von dem chemischen Prozefs unterscheidet, müssen wir auf die neueren Untersuchungen von *Emil Fischer* eingehen. Sie gründen sich auf die grofsartige Entwickelung der Stereochemie im letzten Jahrzehnt und vertreten die Anschauung, dafs bei den Reaktionen verschiedener chemischer Individuen die molekularen Konfigurationen der an der Reaktion beteiligten Körper eine gewisse Übereinstimmung zeigen müssen.

Diese Anschauung scheint ihren Ausgangspunkt in dem abnormalen Verhalten verschiedener Arten von Hefen oder Saccharomyceten gegen verschiedene Zuckerarten genommen zu haben. *Hansen* war auf Grund seiner sehr eingehenden Untersuchungen über die Biologie der Hefenpflanze imstande, mindestens 10 bestimmte Arten dieses Genus zu bestimmen, deren Lebensgeschichte und Fähigkeit, Gärung zu erregen, er sehr genau erforschte. Von diesen 10 Arten hydrolysieren 6 sowohl Rohrzucker als auch Maltose unter Bildung von Hexosen. Dann veranlassen sie auf Kosten dieser Hexosen die alkoholische Gärung. Saccharomyces Marxianus vermag Maltose nicht anzugreifen, er hydrolysiert aber Rohrzucker. S. membranaefaciens invertiert keinen der

Digitized by Google

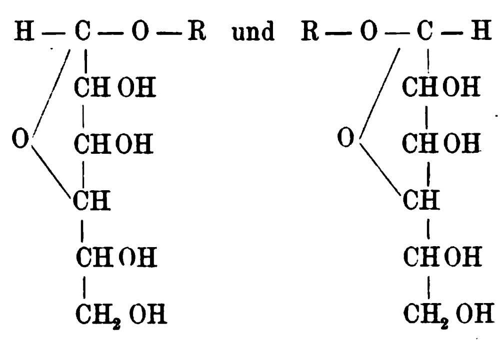
beiden Zucker, die er auch nicht vergärt. Gegen eine besondere Hefenart verhalten sich die Zucker in Bezug auf Gärfähigkeit verschieden. Die Biosen-Polysaccharide Rohrzucker, Maltose und Trehalose vermögen Alkohol zu bilden, sie müssen jedoch zuvor in Hexosen verwandelt werden. Von letzteren werden Dextrose und Lävulose am leichtesten vergoren. Die Galaktose ist sehr widerstandsfähig, doch giebt *Bourquelot* an, sie sei vergärbar, wenn eine kleine Menge Dextrose, Lävulose oder Maltose zugegen sei, sonst aber nicht. Laktose ist nach den Angaben von *Duclaux* und *Kayser* durch drei Hefearten vergärbar.

Fischer wurde durch diese Thatsachen zu der Vermutung geführt, dafs diese Fermente nur diejenigen Zuckerarten angreifen können, die eine ihrer eigenen ähnliche molekulare Konfiguration besitzen. Die Untersuchungen, die er unter Benutzung verschiedener Enzyme durchführte, ermöglichte es ihm, diese Anschauung auf die Gärung im allgemeinen zu übertragen, möge diese nun durch lebendes Protoplasma oder die durch dieses ausgeschiedenen Enzyme bewirkt werden. Seine ersten Untersuchungen befafsten sich mit dem Verhalten der Glukase gegen verschiedene Zucker und Glukoside.

Wird eine Lösung von Zucker in Methylalkohol mit Salzsäure gesättigt, so verliert sie ihr Kupferreduktionsvermögen; es bildet sich eine krystallisierbare Verbindung von der Formel $C_6H_{11}O_6CH_3$ nach der Gleichung $C_6H_{12}O_6 + CH_3OH = C_6H_{11}O_6CH_3 + H_2O$. Die gleiche Reaktion findet mit allen Alkoholen statt, die Zucker zu lösen imstande sind: die dabei entstehenden Verbindungen entsprechen den natürlichen Glukosiden. Der in Reaktion tretende Zucker mufs nicht unbedingt Dextrose sein, so dafs man auf diese Weise eine Reihe künstlicher Methylglukoside darstellen kann. Diese Körper werden weder durch *Fehling*sche Lösung, noch durch Phenylhydrazin oder Ätznatron verändert, beim Kochen mit verdünnten Säuren jedoch nehmen sie Wasser auf und werden in Zucker und Alkohol zerlegt.

Die Theorie verlangt die Existenz von zwei Glukosiden, die beide durch Einwirkung von Salzsäure auf eine Lösung von d-Glukose in Methylalkohol gebildet werden. Nach *Fischer* haben sie folgende Formel, in der R die Gruppe CH_3 bedeutet:

Digitized by Google



Fischer nennt sie α- und β-Methyl-Glukosid. Er liefs auf diese neuen Verbindungen (die sich nur in der Konfiguration des einen asymmetrischen Kohlenstoffatoms unterscheiden) Glukase einwirken, die er durch Digestion von Hefe mit der 15fachen Gewichtsmenge Wasser 15 Stunden lang bei 30—35° C. und darauffolgendes Filtrieren dargestellt hatte. Der α-Körper wird von dem Enzym nach 20stündiger Einwirkung zersetzt. Die Menge der Glukaselösung betrug $^1/_{20}$ der Menge der Glukosidlösung, die Temperatur betrug 30—35° C. Ungefähr die Hälfte des Glukosides wurde in Glukose und Alkohol verwandelt.

Die β-Verbindung, die in der gleichen Weise geprüft wurde, blieb gänzlich unverändert.

Fischer stellte auch das α-Äthylglukosid dar und fand, dafs es ganz ebenso zersetzt wurde, wie die entsprechende Methylverbindung. Auf die künstlichen Glukoside, die aus l-Glukose dargestellt waren, war die Glukase ohne Wirkung; auch die Galaktoseverbindungen wurden durch Glukase nicht zersetzt.

Benutzte man an Stelle der d-Glukose gewöhnliche d-Fruktose (Lävulose), so wurden die Glukoside vom α-Typus durch Glukose zersetzt. Invertase konnte diese Zersetzung nicht bewirken.

Fischer schreibt dieses verschiedenartige Verhalten dem Unterschied in der Konfiguration der Zuckermoleküle in den verschiedenen Fällen zu. Diese Ansicht wird noch wahrscheinlicher gemacht durch die Thatsache, dafs jedes der Biose-Polysaccharide von einem bestimmten Enzym hydrolysiert wird, Rohrzucker von Invertase, Maltose von Glukase, Milchzucker von Laktase und andere von anderen Enzymen, wie im Kapitel IX dieses Buches

Digitized by Google

beschrieben wurde. Wenn der Grund eine Übereinstimmung in der Konfiguration zwischen Zucker und Enzym ist, so wäre damit auch erklärt, warum Glukase das Methyl-Galaktosid ebenso wenig zersetzt wie Laktose, die bei der Hydrolyse Galaktose und Glukose liefert.

Fischer dehnte seine Beobachtungen weiter aus und studierte auch noch die Wirkung der Glukase auf die aromatischen Glukoside. Er fand, dafs sie viele derselben nicht anzugreifen vermag, dafs sie jedoch Amygdalin zersetzt, wobei jedoch nur das Zuckerradikal des komplexen Moleküles in Mitleidenschaft gezogen wird. Statt ebenso zu wirken wie das Emulsin d. h. statt Bittermandelöl und Blausäure nebst zwei Molekülen Glukose zu bilden, spaltete die Glukase nur ein Molekül Glukose ab unter Bildung eines neuen Glukosides, das das andere Hexosenmolekül enthielt.

Fischer studierte sowohl die Wirkung des Emulsins als auch der Glukase auf die künstlichen Glukoside. Er fand, dafs ebenso wie die Glukase auch das Emulsin die Glukoside der d-Glukose angriff, doch die der Galaktose und ähnlicher Zucker nicht anzugreifen vermochte. Auf die Methyl-l-Glukoside war es ohne Einwirkung. Seine Wirkungsweise unterschied sich jedoch deutlich von der der Glukase, denn es zersetzt nur die Glukoside von der β-Konstitution, während Glukase nur die die α-Gruppe zersetzt.

Fischer fand, dafs Emulsin auf Methyl-d-Mannosid, Methyl-Sorbosid und Methyl-Galaktosid ohne Wirkung war. Es zersetzte weder die α- noch die β-Form von Methyl-Glukosid aus l-Glukose.

Myrosin zeigte ähnliche Unterschiede; es spaltete das α-Methyl-d-Glukosid, aber nicht die β-Verbindung.

Glukase aus Hefe griff Methyl-Sorbosid nicht an, ebenso wenig Methyl-Mannosid, dargestellt aus Reserve-Cellulose.

Auf Grund dieser Untersuchungen von *Fischer* kommen wir zu folgender, in der Hauptsache von *Fischer* selbst aufgestellten Theorie. Die Enzyme sind wahrscheinlich nukleo-albuminartiger Natur, ebenso wie die wahren Eiweifsstoffe optisch aktive Substanzen, und deswegen besitzen ihre Moleküle eine asymmetrische Struktur. Da die vorstehenden Untersuchungen zeigen, dafs die Wirkung der Enzyme eine auswählende ist, so folgt daraus, dafs

Digitized by Google

die Substanzen, die sie unter geeigneten Versuchsbedingungen zu zersetzen vermögen, eine ihrer eigenen entsprechende Konfiguration besitzen müssen. Man kann annehmen, dafs zwischen den beiden Molekülen eine ähnliche gegenseitige Beziehung besteht wie zwischen Schlüssel und dem dazugehörigen Schlüsselloch.

Die zu einander gehörigen Konfigurationen der beiden Körper Zucker und Enzym machen die Zersetzung des ersteren durch letzteres verständlich. *Fischer* legt besonderes Gewicht auf das Verhalten der α- und β-Methylglukoside gegen Glukase. Die beiden Glukoside haben dieselbe Zusammensetzung, werden aus demselben Alkohol und demselben Zucker gebildet und unterscheiden sich nur in der Konfiguration eines einzigen Kohlenstoffatomes, das durch die Einführung der Methylgruppe in den Zucker asymmetrisch wird.

Dieselbe Beziehung kann sehr wohl auch zwischen den anderen, nicht zuckerzersetzenden Enzymen und den Körpern bestehen, die sie zersetzen. Letztere sind zumeist asymmetrische Substanzen.

Wir können nun zur Betrachtung der Frage zurückkehren, ob die wirklichen Gärprozesse sich am besten mittelst einer physikalischen oder chemischen Hypothese erklären lassen.

Die ursprüngliche *Liebig*sche Stellung verlangt eine vibratorische Bewegung der Moleküle des die Gärung erregenden Körpers, und er brachte diese Bewegung mit der in Zersetzung begriffenen Stickstoffsubstanz in der Lösung in Verbindung. Diese Anschauung wurde teils von ihm selbst, teils von seinen Nachfolgern dahin modifiziert, dafs die Vibrationen von den lebenden Zellen oder einer von ihnen ausgeschiedenen Substanz ausgingen. *Fischers* Theorie ist mit dieser Anschauungsweise nicht unvereinbar; es erklärt diese vielmehr die selektiven Gärungen, die von verschiedenen ausgeschiedenen Körpern oder Enzymen hervorgerufen werden, indem es den Anschein gewinnt, dafs nur solche Körper in eine stärkere Molekular-Vibration versetzt werden können, die eine ähnliche Konfiguration besitzen wie das Enzym.

Doch befriedigt eine auf die molekulare Vibration gegründete Theorie nicht, angesichts dessen, was wir nun über die Natur der Enzyme wissen, so wenig dies auch ist. Sie befinden sich nicht in stetiger Zersetzung, wie es der Fall war mit *Liebigs* organischer

Digitized by Google

Stickstoffsubstanz. Andererseits sind sie ziemlich beständige Substanzen, selbst in wässeriger Lösung. Überdies gewinnt es im Lichte der bereits erwähnten Beobachtungen den Anschein, dafs sie mit den von ihnen zu hydrolysierenden Körpern eine Art Verbindung eingehen.

Berzelius wies schon vor langer Zeit die *Liebig*sche Theorie der molekularen Vibration zu gunsten einer Theorie der Kontaktwirkung zurück, die der Wirkung von Platinmohr auf sauerstoffhaltiges Wasser vergleichbar sei. Nicht nur Platinmohr, sondern auch viele andere Körper, feingepulverte Holzkohle, Braunstein oder fein gefälltes Silber entwickeln aus mit Sauerstoff gesättigtem Wasser letzteren in Blasen. Viele der Enzyme bewirken dasselbe, sie besitzen alle diese Eigentümlichkeit, neben den bereits beschriebenen Fähigkeiten. *Schönbein*, der zuerst diese Eigentümlichkeit beobachtete, brachte sie in besonderen Zusammenhang mit ihrem Gärvermögen. *Jacobson* zeigte, dafs dies nicht der Fall ist, denn wenn sie vorsichtig und allmählich erhitzt werden, verlieren ihre Lösungen diese Eigenschaft früher als die übrigen Eigenschaften, wie sie sich in ihren spezifischen Wirkungen äufsern.

Doch ist hiermit die den Enzymen eigentümliche Wirkungsweise keineswegs aufgeklärt. Auch sind Platinmohr und Enzym zwei so unähnliche Körper, dafs man deren Verhalten keinesfalls als identisch betrachten kann.

Es wurde auch die Hypothese aufgestellt, dafs Gärung auf elektrische Hydrolyse zurückzuführen sei, dafs nämlich durch die Wirkung der Elektrizität dem Zucker die Elemente des Wassers entzogen und dann wieder in anderer Anordnung zugeführt würden, so dafs also in der Flüssigkeit eine elektrische Wasseranlagerung und Wasserentziehung stattfinde. Diese Hypothese fand bei *Arnstrong* Beifall, der weiter ausführte, dafs hierbei die Annahme von einer wirklichen Abtrennung der Elemente des Wassers aus dem Molekül und deren spätere Wiedereinführung gar nicht nötig sei, sondern dafs die Wirkung sich durch eine Art elektrischen Austausches erklären lasse, der räumlich im Molekül sich abspiele. Bei dieser Hypothese liefse sich die Rolle des Enzyms oder des Organismus so erklären, dafs es den galvanischen Kreislauf vervollständige und dem elektrischen Strom den Durchgang vermittele. Es läuft diese Anschauung der *Fischer*-

Digitized by Google

schen Theorie nicht zuwider, da die enge Annäherung der beiden in Frage kommenden Körper, so, dafs dadurch dem Strom der Weg geebnet wird, sehr wohl davon abhängen kann, dafs sie eine entsprechende Konfiguration besitzen. Diese Hypothese verlangt aber, dafs die Enzyme Elektrolyten sind, und dafür haben wir keinen Beweis.

Eine anders geartete physikalische Hypothese stellte *de Jager* auf. Ausgehend von *Nägelis* Anschauung, dafs gärende Hefezellen Vibrationen aussenden, die von den Zellen ausgehen und den Zucker in der benachbarten Lösung zersetzen, vermutet *de Jager*, dafs die Enzyme nicht lediglich als Substanzen zu betrachten seien, sondern als die Vibrationen selbst, d. h. also nicht als die Materie selbst, sondern als Eigenschaften derselben. Er vergleicht sie mit anderen physikalischen Kräften, mit dem Licht, der Elektrizität, dem Magnetismus. Die Gärung bestände hiernach in chemischen Umwandlungen, die durch physikalische Kräfte bewirkt werden und nicht die Folge wären von der chemischen Einwirkung einer molekularen Substanz.

Diese Theorie hat neuerdings *Maurice Arthus* wieder aufgegriffen und weiter ausgearbeitet, der in sehr geistreicher Weise die Eigenschaften der Enzyme mit denen verschiedener physikalischer Kräfte verglichen hat. Er legt hauptsächlich Gewicht auf zwei Thatsachen: 1. dafs selbst die hervorragendsten Chemiker nicht imstande waren, die Zusammensetzung des Enzyms zu ermitteln und dafs alle ihre Versuche zu dem Ergebnis führten, dafs diese Körper, wenn sie existieren, nicht von Verunreinigungen befreit werden können; 2. dafs unendlich kleine Mengen Enzym grofse Mengen der ihrer Wirkung unterliegenden Körper zersetzen können. Er hält die Übertragungs-Theorie von *Bunsen* für gänzlich unzulänglich für die Erklärung dieses aufserordentlichen Mifsverhältnisses. Ferner bemüht er sich, zu zeigen, dafs ihre verschiedenen sogenannten „Eigenschaften“ mit den Eigenschaften der verschiedenen physikalischen Agentien übereinstimmen, mit denen er sie in eine Reihe stellte.

Wenn auch diese Theorie geistreich ist, so läfst sie sich doch nicht mit den wohl charakteristischen Prozessen der Bildung oder Sekretion in Einklang bringen, die man sowohl im Tier- als auch im Pflanzengewebe beobachten kann. Die verschiedenen

Digitized by Google

Reaktionen, die sie aufweisen, ihre Löslichkeit und Ausfällbarkeit, ihr verschiedenes Dialysiervermögen, alles das deutet viel mehr darauf hin, dafs sie ganz bestimmte materielle Wesen sind.

Die Ansicht, dafs die Wirkung der Enzyme mehr einen chemischen als physikalischen Charakter besitzt, hat mehrere gewichtige Stützen. Viele von ihnen rufen hydrolytische Reaktionen hervor; der fermentierende Körper nimmt Wasser auf und zerfällt dann. Die meisten dieser Umwandlungen können im Laboratorium mit gewöhnlichen chemischen Reagentien bewirkt werden — die Stärke kann mit Mineralsäuren oder organischen Säuren hydrolysiert werden; dieselben Körper machen aus Rohrzucker Dextrose und Lävulose; die Fette können durch Alkalien oder überhitzten Dampf zersetzt werden; Peptone können durch Erhitzen von Eiweifs auf hohe Temperatur im *Papin*schen Topf gebildet werden. Untersucht man die enzymatischen Umwandlungen genauer, so zeigen sie eine weitgehende Übereinstimmung im einzelnen mit rein chemischen Prozessen. Bei den im vorigen Kapitel mitgeteilten Untersuchungen über Invertase stellten *O'Sullivan* und *Tompson* fest, dafs der Grad der durch das Enzym bewirkten Inversion des Rohrzuckers durch eine bestimmte Zeitkurve dargestellt werden kann, die „praktisch dieselbe ist wie die von *Harcourt* angegebene; sie drückt eine chemische Umwandlung aus, bei der sich nichts ändert, aufser der Abnahme der der Veränderung unterliegenden Substanz“ (*O'Sullivan* und *Tompson*, „On Invertase“. Journ. Chem. Soc. 1890, S. 926). Sie folgt also dem von *Harcourt* aufgestellten Gesetz, dafs bei der Umwandlung einer Substanz unter derartigen Bedingungen der zu einem bestimmten Zeitpunkt zutreffende Grad der Umsetzung direkt proportional ist der Menge der Substanz. *J. O'Sullivan* fand ferner, dafs auch die hydrolytische Wirkung der Hefe bei gewöhnlicher Temperatur den Verlauf einer einfachen chemischen Umwandlung zeigt.

Wenn wir aber auch diese Ansicht als richtig annehmen, dafs also eine gewöhnliche chemische Reaktion zur Wasseranlagerung und dann zum Zerfall führt, so müssen wir doch noch die Frage beantworten: Welches ist die exakte Natur dieser Reaktion? Die Erklärung der letzteren mufs auch die komplexeren Veränderungen in sich begreifen, die den thatsächlichen Zerfall des Moleküls

Digitized by Google

bewirken und die bei dem Myrosin und der *Buchner*schen Zymase in den Vordergrund treten.

Wenn wir die Frage der chemischen Veränderungen betrachten, die die Enzyme bewirken, so fällt dem Beobachter als erstes die aufserordentlich kleine Menge auf, die davon nötig ist, um die Umwandlung enormer Mengen der von ihnen angegriffenen Körper durchzuführen. So zeigten *O'Sullivan* und *Tompson* bei einem ihrer Versuche, dafs die Invertase die 200000fache Menge Rohrzucker zu invertieren vermag. Dabei wurde sie noch nicht einmal zerstört oder in ihrer Wirksamkeit wesentlich beeinträchtigt. Die Zersetzung eines Enzyms während seiner Thätigkeit geht, wie *Tamman* gezeigt hat, sehr langsam und allmählich von statten und wird von Temperaturunterschieden ebenso beeinflufst, wie ihre Wirksamkeit selbst. Diese Betrachtungen machen die Ansicht von *Buchner* und *Hüfner* sehr wahrscheinlich, dafs die enzymatische Wirkung dem Verhalten des Stickoxyds bei der Schwefelsäurefabrikation oder dem der Schwefelsäure bei der Ätherfabrikation ähnlich sei. Bei dem erstgenannten Prozefs trifft ein Strom schwefliger Säure, gemischt mit Sauerstoff, bei Gegenwart von Wasser mit Stickoxyd zusammen, wobei die Weiteroxydation der schwefligen Säure sich mit grofser Schnelligkeit vollzieht. Eine kleine Menge Stickoxyd bewirkt die Vereinigung unbegrenzter Mengen schwefliger Säure mit Sauerstoff. Das Stickoxyd verwandelt sich bei Gegenwart von Sauerstoff sofort in Untersalpetersäure, die die schweflige Säure bei Gegenwart von viel Wasser zu Schwefelsäure oxydiert, wobei das ursprüngliche Stickoxyd regeneriert wird. Dieser Vorgang wiederholt sich so lange als noch nicht oxydierte schweflige Säure und freier Sauerstoff vorhanden sind.

Die Wirkung der Schwefelsäure bei der Ätherfabrikation ist ähnlich. Zunächst findet eine Zwischenreaktion statt nach folgender Gleichung:

$$\underset{\text{Alkohol}}{C_2H_5OH} + \underset{\text{Schwefelsäure}}{H_2SO_4} = \underset{\text{Äthylsulfat}}{C_2H_5HSO_4} + \underset{\text{Wasser}}{H_2O}$$

Das Äthylsulfat reagiert alsdann mit einem zweiten Molekül Alkohol nach folgender Gleichung:

$$\underset{\text{Äthylsulfat}}{C_2H_5HSO_4} + \underset{\text{Alkohol}}{C_2H_5OH} = \underset{\text{Äther}}{(C_2H_5)_2O} + \underset{\text{Schwefelsäure}}{H_2SO_4}$$

Digitized by Google

Auf der Grundlage dieser Reaktionen kann man annehmen, dafs das Enzym sich mit dem Körper, auf den es einwirkt, verbindet, mit oder ohne Entziehung oder Zuführung von Wasser. Die neue Verbindung zersetzt sich mit einem weiteren Molekül desselben Körpers unter Bildung des Körpers, der das Endprodukt der Reaktion des Enzyms darstellt, wobei letzteres wieder unverändert in Freiheit gesetzt wird.

Diese Anschauung ist bislang noch eine hypothetische, da man bisher noch keine Verbindung des Enzyms mit dem Körper, den es angreift, isoliert hat. Wie wir jedoch im letzten Kapitel sahen, hatten *O'Sullivan* und *Tompson* allen Grund zur Annahme einer derartigen Verbindung; diese Annahme stützte sich auf die Einwirkung der Wärme auf die Invertase bei Gegenwart und Abwesenheit von Rohrzucker in der zu prüfenden Lösung. *Matthieu* und *Hallopeau* glaubten aus ihren Untersuchungen schliefsen zu dürfen, dafs bei der Einwirkung des Pepsins im Magen das Chlor der Salzsäure mit den Eiweifssubstanzen und selbst mit dem Pepton eine Verbindung eingeht. Ist dieser Schlufs wohl begründet, dann ist die Säure möglicherweise ein Bindemittel zwischen Pepsin und Eiweifs, denn, wie wir wissen, steht sie zu dem ersteren in sehr naher Beziehung, wenn sie nicht damit ganz und gar verbunden ist.

Bestätigt sich diese Hypothese, dann steht die Wirkung der Enzyme auf einer Stufe mit anderen chemischen Reaktionen. Für letztere ist es charakteristisch, dafs die Umsetzung zwischen zwei in einer und derselben Lösung befindlichen reaktionsfähigen Substanzen nur dann eine vollkommene sein wird, wenn eins der gebildeten Produkte so schnell als möglich entfernt wird. Alle vier möglichen Körper bilden sich in einem bestimmten Verhältnis, das von verschiedenen Bedingungen abhängig ist, und die chemische Umsetzung hört erst dann auf, wenn ein bestimmter Punkt des dynamischen Gleichgewichtes zwischen denselben erreicht ist. Dieser Punkt mufs unter anderem von der relativen Menge der in der Lösung befindlichen reagierenden Körper abhängen und wird dementsprechend variieren.

Das Verhalten zwischen Schwefelsäure und Alkohol erläutert diese Verhältnisse sehr gut. So lange Alkohol im Überschufs vorhanden ist, wird sich das zuerst gebildete Äthylsulfat mit ihm

Digitized by Google

in der oben beschriebenen Weise verbinden, wobei Äther gebildet wird. Ist jedoch Wasser im Überschufs vorhanden, so vollzieht sich die Reaktion in der entgegengesetzten Richtung, indem das Äthylsulfat wieder in seine ursprünglichen Komponenten zerfällt:

$$\underset{\text{Äthylsulfat}}{C_2H_5HSO_4} + \underset{\text{Wasser}}{H_2O} = \underset{\text{Alkohol}}{C_2H_5OH} + \underset{\text{Schwefelsäure}}{H_2SO_4}$$

Bei diesem Prozefs finden sich also alle vier Körper: Alkohol, Schwefelsäure, Äther und Wasser nebeneinander und der schliefsliche Gleichgewichtspunkt hängt von dem Verhältnis zwischen Alkohol, Wasser und Schwefelsäure ab.

Wir müssen daher erwarten, dafs bei der Wirkung der Enzyme die fortlaufende und vollständige Zersetzung der ursprünglichen Substanz, auf die das Enzym einwirkt, nur dann sich vollziehen kann, wenn das gebildete Endprodukt sofort nach seinem Erscheinen entfernt wird. Geschieht dies nicht, so setzt die Reaktion im Anfang stark ein, wird jedoch allmählich langsamer, bis der Gleichgewichtszustand erreicht ist und die Reaktion ganz aufhört. Dies hat man auch in sehr vielen Fällen beobachtet. *Tammann* zeigte, dafs die Wirkung des Emulsins auf Amygdalin durch eine Anhäufung der Zersetzungsprodukte beträchtlich gehemmt wird und dafs dies durchaus nicht auf eine Zerstörung des Enzyms zurückzuführen sei. *Brown* und *Morris* wiesen nach, dafs es fast unmöglich ist, Stärke vollständig mit Diastase zu verzuckern; es verbleiben immer etwa 20 % Dextrin. *Lea* fand, dafs die Hydrolyse vollständig wird, wenn der Zucker sofort nach seiner Bildung entfernt wird.

Wenn hinwiederum die bezüglichen Mengen der beteiligten Körper den Verlauf der Reaktion regulieren, so müfste ein Enzym imstande sein, bis zu einem gewissen Grade eine entgegengesetzte Reaktion zu bewirken, wenn man es auf das Endprodukt anstatt auf das Ausgangsmaterial einwirken läfst. Neuerdings durchgeführte Untersuchungen haben dargethan, dafs sich in der That die Enzyme so verhalten.

In den Jahren 1897 und 1898 prüfte *Croft Hill* eingehend die Einwirkung der Maltase oder Glukase auf Maltose. Er stellte das Enzym aus getrockneter Hefe unter antiseptischen Vorsichtsmafsregeln dar; die Versuche wurden ferner zur Ausschaltung

Digitized by Google

von Bakterienwirkungen unter Mitbenutzung von Toluol durchgeführt. *Hill* fand, dafs die Gegenwart von Glukose merklich hemmend auf die Hydrolyse der Maltose einwirkte; diese Wirkung war um so intensiver, je konzentrierter die Zuckerlösungen waren. Wurde das Enzym mit 40prozentigen Glukoselösungen bei 30° C. digeriert, so fand eine langsame Umwandlung der letzteren in Maltose statt. Deren Menge wurde im Verlaufe des Versuches durch Bestimmung des optischen Drehvermögens, sowie des Kupferreduktionsvermögens bestimmt. Nach fünf Tagen waren 3,25 % der Glukose umgewandelt, nach 28 Tagen 10 % und nach 70 Tagen 14,5 %. Darüber hinaus fand keine Umwandlung mehr statt, so dafs der Gleichgewichtszustand für diese beiden Zuckerarten erreicht war, wenn die Lösung 85,5 % Glukose und 14,5 % Maltose enthielt. Die quantitativen Bestimmungen wurden aufserdem noch mittelst der Phenylhydrazinprobe kontrolliert; diese lieferte zwei Osazone, Glukosazon und Maltosazon.

Bei einem weiteren Versuche, bei dem ein Gemisch der beiden Zucker, bestehend aus 75 % Glukose und 25 % Maltose, in Arbeit genommen wurde, während die Konzentration der Zuckerlösung wie bei dem ersten Versuch 40 % betrug, wurde derselbe Gleichgewichtspunkt bei einer 56tägigen Digestionsdauer erreicht.

Bei weniger konzentrierten Zuckerlösungen war der Gleichgewichtspunkt nicht der nämliche. Beim Arbeiten mit einer 20prozentigen Zuckerlösung fand *Hill* am Ende des Versuches 90,5 % Glukose und 9,5 % Maltose; bei 10prozentigen Lösungen war das Gleichgewicht erreicht bei 94,5 % Glukose und 5,5 % Maltose. Bei noch verdünnteren Lösungen war die Umwandlung der Maltose noch geringer — bei 4prozentigen Lösungen war das Verhältnis von Glukose zu Maltose 98 : 2, bei 2prozentigen dagegen nur 99 : 1. *Hill* fand also, dafs bei sehr verdünnten Maltoselösungen die Hydrolyse zu Glukose durch das Enzym eine fast vollständige war: bei 20prozentigen Lösungen konnte eine rückläufige Wirkung beobachtet werden, die bei 40prozentigen Lösungen noch deutlicher war.

Diese Versuche von *Croft Hill* stützen sehr die Ansicht, dafs die Wirkung der Glukase eine chemische ist, und dafs

Digitized by Google

die Umwandlung, die sie bewirkt, sich von den gewöhnlichen chemischen Umsetzungen in keinem wesentlichen Punkt unterscheidet.

Die anderen Enzyme müssen in dieser Beziehung noch geprüft werden. Die Zersetzungen, die viele von ihnen bewirken, sind verwickelter als die oben beschriebenen. Die Hydrolyse, die die Diastase z. B. bewirkt, ist, wie wir sahen, eine fortschreitende und keine vollständige, gleichzeitig mit der Maltose werden in dem Verhältnis, in dem die Stärke abgebaut wird, Dextrine von verschiedener Zusammensetzung gebildet. Ebenso führt Trypsin nicht die Umwandlung der Eiweifsstoffe in Peptone und Amide in einer einzigen Operation, sondern in mehreren Phasen durch, von denen jede durch das Auftreten ganz bestimmter Zwischenkörper charakterisiert ist. Die verwickelte Art des Abbaues in diesen Fällen spricht jedoch durchaus nicht gegen die Annahme, dafs der Verlauf der Reaktion derselbe ist, wie in dem bereits beschriebenen Falle.

Fischers Hypothesen von der Abhängigkeit der Reaktion von der Konfiguration der Enzyme wirft vielleicht etwas Licht auf deren Zerstörung durch Hitze. Man nahm allgemein an, dafs sie bei den Höchsttemperaturen gänzlich zersetzt werden, vielleicht durch Hydrolyse. Diese Annahme wird noch wahrscheinlicher durch die Thatsache, dafs die Enzyme im wasserfreien Zustand auf viel höhere Temperaturen erhitzt werden können, ohne zerstört zu werden. *Pavy* zeigte, dafs dies auch der Fall ist, wenn das Wasser statt durch Austrocknung durch Alkohol entzogen wird. Er fand, dafs die Leberdiastase nach dem Kochen mit absolutem Alkohol noch wirksam war. Möglicherweise ist also hiernach der Zerstörungsprozefs auf eine Hydrolyse zurückzuführen. Andererseits ist es auch möglich, dafs durch das Erhitzen eine derartige Änderung in ihrer Konfiguration zuwege gebracht wird, dafs ihre Moleküle nicht mehr denen der Körper, die sie zersetzen, entsprechen. *Tammann* zeigte, dafs ein Enzym auch bei niederer Temperatur seine Wirksamkeit verliert, wenn auch viel langsamer als bei hoher. Mit steigender Temperatur wurden die Enzyme viel schneller unwirksam. Das spricht für die Ansicht, dafs ihre sogenannte Zersetzung nur eine Änderung in der Konfiguration ist.

Digitized by Google

Wir kennen sehr viele Fälle, in denen durch einfaches Erhitzen eine optisch aktive Substanz ihre Konfiguration ändert. Es seien blofs die klassischen Versuche von *Jungfleisch* erwähnt, bei denen gewöhnliche Weinsäure durch Erhitzen in racemische Säure übergeführt wird, die optisch unwirksam ist. Viele andere Beispiele lassen sich hierfür noch aus den *Fischer*schen Untersuchungen in der Zuckerreihe beibringen.

Digitized by Google

Bibliographie.

Abelous et Biarnés. Sur le pouvoir oxydant du sang et des organes. *Compt. Rend. de la Soc. Biol.* S. x. 1 (1894). 536, 799.

Abelous et Heim. Note sur l'existence de ferments digestifs dans les œufs de Crustacées. *Compt. Rend. Soc. Biol.* S. ix. 3 (1892). 273.

Alcock, Miss. The digestive processes of Ammocœtes. *Proc. Camb. Phil. Soc.* 7 (1891). 252.

Arthur, J. C. The movement of protoplasm in cœnocytic hyphæ. *Annals of Botany* 11 (1897). 501.

Arthus. Glycolyse dans le sang et ferment glycolytique. *Arch. de Physiol.* (5) 3 (1891). 425.

Arthus. Glycolyse dans le sang. *Compt. Rend.* 114 (1892). 605.

Arthus. Fibrinogène et Fibrine. *Compt. Rend. Soc. Biol.* S. x. 1 (1894). 306.

Arthus et Huber. Fermentations vitales et fermentations chimiques. *Compt. Rend.* 115 (1892). 839.

Arthus et Pagès. Recherches sur l'action du lab et la coagulation du lait. *Arch. de Physiologie* (5) 2 (1890). 335.

Arthus et Pagès. Nouvelle théorie chimique de la coagulation du sang. *Arch. de physiol. norm. et path.* (5) 2 (1890). 739.

Arthus, M. Nature des Enzymes. *Thèse pour le Doctorat en Médecine.* Paris 1896.

Astachewsky. Reaktion des Parotisspeichels beim gesunden Menschen. *Centr. f. d. med. Wissensch.* 16 (1878). 257.

Astier. Expériences faites sur le sirop et le sucre de raisin. *Ann. de Chimie* t. lxxxvii. (1813). 271.

Atkinson. Note on the action of the new diastase *Eurotin* onstarch. *Chemical News* 1880. 169.

Baeyer, A. Über die Wasserentziehung und ihre Bedeutung für das Pflanzenleben und die Gärung. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* (1870). 63, auch *Journ. Chem. Soc. Trans.* (1871). 331.

Baginsky. Über das Vorkommen und Verhalten einiger Fermente. *Zeit. physiol. Chem.* 7 (1882). 209.

Baranetzky. Die stärkeumbildenden Fermente. 1878.

Bau. Melibiase. *Chem. Zeit.* (1895). 19. 1873.

Barth. Zur Kenntnis des Invertins. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* xi. (1878). 474.

Digitized by Google

De Bary. Über die Myxomyceten. *Bot. Zeit.* 16 (1858). 357 u. f.

De Bary. Sur la fermentation de la cellulose. *Bull. Soc. Bot. de France* 26 (1879). 25.

De Bary. Über einige Sclerotinien und Sclerotien-Krankheiten. *Bot. Zeit.* 1886. 377 u. f.

De Bary. Lectures on Bacteria. Eng. Trans. Oxford 1887.

Bauer. Über eine aus Äpfelpektin entstehende Zuckerart. *Landw. Versuchsstat.* 43. 191.

Béchamp. Sur l'acide acétique et les acides gras volatils de la fermentation alcoolique. *Compt. Rend.* 56 (1863). 969, 1086, 1231.

Béchamp. Sur la fermentation alcoolique. *Compt. Rend.* 57 (1863). 674.

Béchamp. Sur des nouveaux ferments solubles. *Compt. Rend.* 59 (1864). 496.

Béchamp. Recherches sur la théorie physiologique de la fermentation alcoolique par la levure de bière. *Compt. Rend.* 75 (1872). 1036.

Béchamp. *Mem. Académie Sciences* 28, 269, 347, 352.

Béchamp. Existe-t-il une digestion sans ferments digestifs des matières albuminoïdes? *Compt. Rend.* 118 (1894). 1157.

Bendersky. Über die Ausscheidung der Verdauungsfermente aus dem Organismus bei gesunden und kranken Menschen. *Virchow's Archiv* 121 (1890). 554.

Benjamin. Beiträge zur Lehre von der Labgerinnung. *Virchow's Archiv* 145 (1896). 30.

Bernard, Claud. De l'assimilation du sucre de canne. *Mem. Soc. Biol. Paris* 1849. 114.

Bernard, Claud. Recherches sur les usages du suc pancréatique dans la digestion. *Compt. Rend.* 28 (1849). 249.

Bernard, Claud. Critique expérimentale sur le mécanisme de la formation du sucre dans le foie. *Compt. Rend.* 85 (1877). 519.

Bernard, Claud. Leçons sur les phénomènes de la vie. Paris 1878—9.

Bernard, Claud. La fermentation alcoolique. Mitgeteilt durch Berthelot der *Rev. Scientifique*, Juli 20, 1878, Seite 49.

Berthelot. Sur la fermentation glucosique du sucre de canne. *Compt. Rend.* 50 (1860). 980.

Bertrand. Sur le latex de l'arbre à laque. *Compt. Rend.* 118 (1894). 1215.

Bertrand. Recherches sur le latex de l'arbre à laque du Tonkin. *Bull. Soc. Chim.* (3) (1894). 11, 717.

Bertrand. Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. *Compt Rend.* 120 (1895). 266.

Bertrand. Sur la Recherche et la précense de la laccase dans les végétaux. *Compt. Rend.* 121 (1895). 166.

Bertrand. Sur une nouvelle oxydase ou ferment soluble oxydant, d'origine végétale. *Bull. de la Soc. Chim.* (3) xv. (1896). 793.

Bertrand. Sur les rapports qui existent entre la constitution chimique des composés organiques, et leur oxydabilité sous l'influence de la laccase. *Compt. Rend.* 122 (1896). 1132.

Bertrand. Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Compt. Rend.* 123 (1896). 463.

Digitized by Google

BERTRAND. Sur l'intervention du manganèse dans les oxydations provoquées par la laccase. *Compt. Rend.* 124 (1897). 1032.

BERTRAND. Sur l'action oxydante des sels manganeux et sur la constitution chimique des oxydases. *Compt. Rend.* 124 (1897). 1355.

BERTRAND et MALLÈVRE. Recherches sur la Pectase et sur la fermentation pectique. *Morot's Journ. de Botanique* 8 (1894). 340.

BERTRAND et MALLÈVRE. Sur la pectase et sur la fermentation pectique. *Compt. Rend.* 119 (1894). 1012.

BERTRAND et MALLÈVRE. Nouvelles recherches sur la pectase et la fermentation pectique. *Compt. Rend.* 120 (1895). 110.

BERTRAND et MALLÈVRE. Sur la diffusion de la Pectase dans le règne végétal et sur la préparation de cette diastase. *Morot's Journ. de Botanique* 10 (1896). 37.

BERTRAND et MALLÈVRE. Sur la diffusion de la pectase dans le règne végétal, et sur la préparation de cette diastase. *Compt. Rend.* 121 (1895). 726.

BEYERINCK. Recherches sur la contagiosité de la maladie de gomme chez les plantes. *Archives Néerlandaises* 19 (1884). 43.

BEYERINCK. Die Lactase, ein neues Enzym. *Cent. f. Bact.* 1890. Bd. 6. 44.

BEYERINCK. Sur l'aliment photogène et l'aliment plastique des Bactéries lumineuses. *Archiv Néerlandais* 24 (1891). 369.

BEYERINCK. Über Nachweis und Verbreitung der Glukase, das Enzym der Maltose. *Cent. f. Bact.* 1895 II. Abt. Bd. I. 229, 265, 329.

BEYERINCK. Über die Arten der Essigbakterien. *Cent. f. Bact.* II. Abt. 1898. 209.

BIAL (34, 126). Über die diastatische Wirkung des Blut- und Lymphserums. *Pflüger's Archiv* 52 (1892). 137.

BIAL. Weitere Beobachtungen über das diastatische Ferment des Blutes. *Pflüger's Archiv* 53 (1893). 156.

BIAL. Über die Beziehungen des diastatischen Fermentes des Blutes und der Lymphe zur Zuckerbildung in der Leber. *Pflüger's Archiv* 55 (1894). 434.

BIERNACKI. Das Verhalten der Verdauungsenzyme bei Temperaturerhöhungen. *Zeit. Biol.* 28 (1891). 49.

BIONDI. Beiträge zur Lehre der fermentativen Prozesse in den Organen. *Virchow's Archiv* 144 (1896). 373.

BOEHM. *Sitzber. d. k. Akad. d. Wiss. in Wien* 71 (1875).

BOEHM. Über Stärkebildung aus Zucker. *Bot. Zeit.* 1883. 33, 49.

BÖMER. *Zeit. Analyt. Chem.* 1895. 562.

BOKORNY. *Allg. Brauer- und Hopfen-Zeitg.* 36 (1896). 1573, 1591.

BONDONNEAU. Dextrine pure du malt. *Bull. Soc. Chem.* 23 (1875). 98.

BONDONNEAU. De la saccharification des matières amylacées. *Bull. Soc. Chim. de Paris* 25 (1876). 2 and *Compt. Rend.* 81 (1875). 972, 1210.

BOUCHARDAT et SANDRAS. Des fonctions du pancréas et de son influence dans la digestion des féculents. *Compt. Rend.* 20 (1845). 1085.

BOUCHUT. Sur un ferment digestif contenu dans le suc de figuier. *Compt. Rend.* 91 (1880). 67.

BOUFFARD. Sur la cassage des vins. *Compt. Rend.* 118 (1894). 827.

Digitized by Google

Bouffard. Observations sur quelques propriétés de l'oxydase des vins. *Compt. Rend.* 124 (1897). 706.

Bouffard et Semichon. Contribution à l'étude de l'oxydase des raisins. *Compt. Rend.* 126 (1898). 423.

Bourquelot. Recherches sur les phénomènes de la digestion chez les mollusques céphalopodes. *Thèse pour le Doctorat ès Sciences.* Paris 1894.

Bourquelot. Recherches sur les propriétés physiologiques du maltose. *Journ. de l'Anat. et de la Physiol.* 1886. 193.

Bourquelot. Les fermentations. Paris 1893.

Bourquelot. Sur un ferment soluble nouveau dédoublant le tréhalose en glucose. *Compt. Rend.* 116 (1893). 826.

Bourquelot. Inulase et fermentation alcoolique indirecte de l'inuline. *Compt. Rend.* 116 (1893). 1143.

Bourquelot. Présence d'un ferment analogue à l'émulsine dans les champignons. *Compt. Rend.* 147 (1892). 383 und *Bull. Soc. Mycol. de France* x. 1e fasc. (1894). 49.

Bourquelot. Inulase et fermentation alcoolique indirecte de l'inuline. *Compt. Rend. Soc. Biol.* S. ix. 5 (1893). 481.

Bourquelot. Transformation du Tréhalose en glucose dans les champignons par un ferment soluble: la tréhalase. *Bull. de la Soc. Mycol. de France* T. ix. 3e fasc. (1893). 189.

Bourquelot Les ferments solubles de l'*Aspergillus niger*. *Bull. de la Soc. Mycol. de France* T. ix. 4e fasc. (1893). 230.

Bourquelot. Maltase et fermentation alcoolique du maltose. *Journ. de Pharm. et de Chim.* (6) 2 (1895). 97.

Bourquelot. Sur la consommation du Maltose par les êtres vivants. *Compt. Rend. Soc. Biol.* S. x. 2 (1895). 474.

Bourquelot. Sur l'hydrolyse de raffinose (mélitose) par les ferments solubles. *Journ. pharm. et chim.* 6 ser. 3 (1896). 390.

Bourquelot. Sur la présence dans le *Monotropa hypopythis* d'un glucoside et sur le ferment soluble hydrolysant ce glucoside. *Compt. Rend.* 122 (1896). 1002 und *Journ. de pharm. et chim.* 3 (1896). 577.

Bourquelot. Des composés oxydables sous l'influence du ferment oxydant des champignons. *Compt. Rend.* 123 (1896). 315.

Bourquelot. Action du ferment soluble oxydant des champignons sur les phénols insolubles dans l'eau. *Compt. Rend.* 123 (1896). 423.

Bourquelot. Nouvelles recherches sur le ferment oxydant des champignons ii. et iii. Son action sur les phénols et sur quelques dérivés éthérés des phénols. *Journ. de pharm. et chim.* (6) 4 (1896). 241. 440.

Bourquelot. Ferments solubles oxydants et médicaments. *Journ. pharm. et chim.* (6) 4 (1896). 481.

Bourquelot. Sur la présence générale dans les champignons d'un ferment oxydant agissant sur la tyrosine. *Bull. de la Soc. Mycol. de France* xiii. (1897). 2e fasc. 65.

Bourquelot. Sur la physiologie du gentianose; son dédoublement par les ferments solubles. *Compt. Rend.* 126 (1898). 1045.

Digitized by Google

Bourquelot et Bertrand. La laccase dans les champignons. *Compt. Rend.* 121 (1895). 783.

Bourquelot et Bertrand. Sur la coloration des tissus et du suc de certains champignons au contact de l'air. *Journ. pharm. et chim.* 63 (1896). 177.

Bourquelot et Bertrand. Les ferments oxydants dans les champignons. *Bull. de la Soc. Mycol. de France* T. xii. 1896. 1e fasc. 18.

Bourquelot et Bertrand. Sur la coloration des tissus et du suc de certains champignons au contact de l'air. *Bull. de la Soc. Mycol. de France* T. xii. 1896. 1e fasc. 27.

Bourquelot et Gley. Action du sérum sanguin sur la matière glycogène et sur le maltose. *Soc. de biologie* séance du 30 mars 1895.

Bourquelot et Gley. Digestion du tréhalose. *Compt. Rend. Soc. Biol.* S. x. 2 (1895). 555.

Bourquelot et Graziani. Sur quelques points relatifs à la physiologie du *Penicilium Duclauxi. Bull. de la Soc. Mycol. de France* T. viii. 3e fasc. 1891. 147.

Bourquelot et Hérissey. Sur les propriétés de l'émulsine des champignons. *Compt. Rend.* 121 (1895). 693.

Bourquelot et Hérissey. Les ferments solubles de *Polyporus sulphureus. Bull. de la Soc. Mycol. de France* T. x. 4e fasc. (1895). 235.

Bourquelot et Hérissey. Action de l'émulsine de l'*Aspergillus niger* sur quelques glucosides. *Bull. de la Soc. Mycol. de France* T. xi. 3e fsac. (1896). 199.

Bourquelot et Hérissey. Sur l'hydrolyse du mélézitose par les ferments solubles. *Journ. pharm. et chim.* (6) 4 (1896). 385.

Bourquelot et Hérissey. Über die Hydrolyse der Melezitose durch lösliche Fermente. *Journ. pharm. et chim.* (6) 4 (1896). 385 und *Chem. Centr.* 1897. 1, 30.

Bourquelot et Hérissey. Sur l'existence, dans l'orge germée, d'un ferment soluble, agissant sur la pectine. *Compt. Rend.* 127 (1898). 191.

Bourquelot et Nadrin. Sur la préparation de Gentianose. *Comptes Rend.* 126 (1898). 280.

Boussingault. *Boussingault Agronomie* t. iii. 1864.

Bourton et Fremy. Recherches sur les semences de moutardes noires et blanches. *Compt. Rend.* 9 (1839). 817.

Bourton et Fremy. Recherches sur la fermentation lactique. *Ann. de chim. et phys.* (3) t. 2 (1841). 257.

Boutroux. Sur la fermentation panaire. *Compt. Rend.* 113 (1891). 203.

Braconnot. Recherches sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les végétaux. *Ann. de chim. et phys.* 28 (1825). 173.

Braconnot. Nouvelles observations sur l'acide pectique. *Ann. de chim. et phys.* 30 (1825). 96.

Brasse. Sur la présence de l'amylase dans les feuilles. *Compt. Rend.* 99 (1884). 878.

Bréaudat. Sur le mode de formation de l'indigo dans les procédés d'extraction industriels. Fonctions diastasiques des plantes indigofères. *Compt. Rend.* 127 (1898). 769.

Digitized by Google

Brefeld. Über Gärung. *Landwirt. Jahrbuch* v. 1876.

Brown, A. J. The chemical actions of pure cultivations of *Bacterium aceti. Journ. Chem. Soc. Trans.* 1896. 172.

Brown, A. J. An acetic ferment which forms cellulose. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1896. 432.

Brown, H. T. On the search for a cytolytic enzyme in the digestive tract of certain grain-feeding animals. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1892. 352.

Brown and Escombe. On the depletion of the endosperm of *Hordeum vulgare* during germination. *Proc. Roy. Soc.* Vol. 63 (1898). 3.

Brown and Heron. Contributions to the history of starch and its transformations. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1879. 596.

Brown and Heron. Some observations on the hydrolytic ferments of the pancreas and small intestine. *Proc. Roy. Soc.* 1880. 393.

Brown and Morris. The non-crystallisable products of the action of diastase on starch. *Journ. Chem. Soc.* 47 (1885). 527.

Brown and Morris. The amylodextrin of W. Nägeli and its relation to soluble starch. *Journ. Chem. Soc.* 55 (1889). 449.

Brown and Morris. On the germination of some of the Gramineae. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1890. 458.

Brown and Morris. On the analysis of a beer of the last century. *Trans. Laboratory Club* III. 4 Feb. 1890.

Brown and Morris. A contribution to the chemistry and physiology of foliage leaves. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1893. 604.

Brown and Morris. On the action of diastase in the cold on starchpaste. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1895. 309.

Brown and Morris. On the isomaltose of C. J. Lintner. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1895. 709.

Brown, Morris and Millar. Experimental methods employed in the determination of the products of starch-hydrolysis by diastase. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1897. 72.

Brown, Morris and Millar. Relations of specific rotatory powers and cupric-reducing powers of starch-hydrolysis by diastase. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1897. 115.

Brown and Pickering. Thermal phenomena attending the change in rotatory power of freshly prepared solutions of certain carbohydrates. *Journ Chem. Soc. Trans.* 1897. 758.

Brown and Pickering. Thermochemistry of carbohydrate hydrolysis. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1897. 783.

Brücke. *Wien. Acad. Ber.* (3) 65. 126.

Brücke. Beiträge zur Lehre von der Verdauung. *Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wiss. in Wien* 43 (1861). 601.

Brunton, Lauder, and MacFayden. The Ferment-action of Bacteria. *Proc. Roy. Soc.* 46 (1889). 542.

Buchanan. Contributions to the physiology and pathology of the Animal Fluids. *London Medical Gazette* 18 (1835—6), 50.

Digitized by Google

BUCHANAN. On the coagulation of the blood and other fibriniferous liquids. *London Medical Gazette* 1 (New. ser. 1845). 617.

BUCHNER, E. Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 30 (1897). 117 und 30 (1897). 1110.

BUCHNER, E. Über zellenfreie Gärung. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 31 (1898). 568.

BUCHNER und RAPP. Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 30 (1897). 2668; 31 (1898). 209, 1084, 1090, 1581; 32 (1899). 127.

BÜSGEN. Aspergillus Oryzae. *Ber. d. deut. bot. Gesell.* 3. (1885). LXVI.

BUFALINI. *Ann. di chim. e di farmac.* (4) T. x. 1889. 207.

BUNGE. Textbook of Physiological and Pathological Chemistry. (Englische Übersetzung von Wooldridge.) *London*, 1890.

BUSSEY. Note sur la formation de l'huile essentielle de moutarde. *Compt. Rend.* 9 (1839). 719.

CAMUS. Formation de lipase par le *Penicillium glaucum*. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 49 (1897). 192.

CAMUS. De la lipase dans les cultures d'*Aspergillus niger*. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 49 (1897). 230.

CAZENEUVE. Sur le ferment soluble oxydant de la casse des vins. *Compt. Rend.* 124 (1897). 406.

CAZENEUVE. Sur quelques propriétés du ferment de la casse des vins. *Compt. Rend.* 124 (1897). 781.

CHEVASTELON. Contribution à l'étude des hydrates de carbon. *Thêse pour le Doctorat ès Sciences.* Paris 1894.

CHEVASTELON. Sur l'inuline de l'ail, de la jacinthe, de l'asphodèle et de la tubereuse. *Journ. Pharm.* (6) 2 (1895). 1, 83.

CHITTENDEN. On the proteolytic action of Bromelin, the ferment of Pine-apple juice. *Journ. of Physiol.* XV. (1894). 249.

CHITTENDEN. Human Saliva. *Proc. Amer. Physiol. Soc.* 1898. 3.

CHITTENDEN and AMERMAN. A comparison of natural and artificial gastric digestion. *Journ. of Physiol.* XIV. (1893). 483.

CHITTENDEN and ELY. Influence of Peptones and certain inorganic salts on the diastatic action of Saliva. *Journ. of Physiol.* III. (1880). 327.

CHITTENDEN and GOODWIN. Myosin-Peptone. *Journ. of Physiol.* XII. (1891). 34.

CHITTENDEN and GRISWOLD. *Amer. Chem. Journ.* III. (1881). 305.

CHITTENDEN and HARTWELL. The relative formation of proteoses and peptones in gastric digestion. *Journ. of Physiol.* XII. (1891). 12.

CHITTENDEN and MEARA. A study of the primary products resulting from the action of superheated water on coagulated egg-albumin. *Journ. of Physiol.* XV. (1894). 501.

CHITTENDEN and MENDEL. Proteolysis of crystallized globulin. *Journ. of Physiology* XVII. (1894). 48.

CHITTENDEN, MENDEL and MCDERMOTT. Papaïn-Proteolysis. *Amer. Journ. Physiology* (1898). 1, 255.

CHITTENDEN and PAINTER. Casein Digestion. *Stud. Lab. Physiol. Chem. Yale Univ.* 2 (1887). 156.

Digitized by Google

CHITTENDEN and SMITH. On the primary clevage products formed in the digestion of gluten-casein of wheat by pepsin-hydrochloric acid. *Journ. of Physiology* IX. (1890). 410.

CHITTENDEN and SOLLEY. The primary cleavage products formed in the digestion of gelatin. *Journ. of Physiology* XII. (1891). 23.

COHN. Zur Kenntnis des bei der Pankreasverdauung entstehenden Leucins. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 27 (1894). 2727.

COHN. Zur Kenntnis des bei Pankreasverdauung entstehenden Leucins. *Zeit. f. physiol. Chem.* 20 (1895). 203.

COHNHEIM. Zur Kenntnis der zuckerbildenden Fermente. *Virchow's Archiv* 28 (1863). 241.

COHNSTEIN and MICHAELIS. Über die Veränderung der Chylusfette im Blute. *Pflügers Archiv* 65 (1897). 473.

CONN. Isolierung eines Lab-Fermentes aus Bakterienkulturen. *Centr. f. Bakt.* 12 (1892). 223.

COURMONT et DOYON. La substance toxique qui engendre le tétanos résulte de l'action, sur l'organisme récepteur, d'un ferment soluble fabriqué par le bacille de Nicolaier. *Compt. Rend.* 116 (1893). 593.

CREMER. Über die Umlagerungen der Zuckerarten unter dem Einflusse von Ferment und Zelle. *Zeit. Biol.* 31 (1895). 183.

CROSS and BEVAN. Cellulose. London 1895.

CUBONI. Recherches sur la formation de l'amidon dans les feuilles de la vigne. *Arch. Ital. de Biol.* 7 (1886). 209.

CUISINIER. Sur une nouvelle matière sucrée diastasique et sa fabrication. *Monit. scientif.* 1886. 718.

DACCOMO and TOMMASI. On a proteolytic ferment in *Anagallis arvensis*. *Rev. de Therap.* 59, 470.

DANILEWSKI. Über spezifisch wirkende Körper des natürlichen und künstlichen pankreatischen Saftes. *Virchow's Archiv* 25 (1862). 279.

LE DANTEC. Recherches sur la digestion intracellulaire chez les Protozoaires. 1° et 2° parties. *Ann. de l'Inst. Pasteur* 4 (1890). 776 and 5 (1891). 163.

DARWIN. Insectivorous plants. London 1888.

DASTRE. Solubilité et activité des ferments solubles, en liqueurs alcooliques. *Compt. Rend.* 121 (1895). 899 and *Bull. de l'Acad. des Sciences* 24 (1895). 899.

DASTRE. Recherches sur la glycogène de la lymphe. *Compt. Rend. Soc. Biol.* S. X. 2 (1895). 242.

DASTRE et BOURQUELOT. De l'assimilation du maltose. *Compt. Rend.* 98 (1884). 1604.

DASTRE et FLORESCO. Liquéfaction de la gélatine. Digestion saline de la gélatine. *Compt. Rend.* 121 (1895). 615.

DASTRE et FLORESCO. Contribution à l'étude du ferment coagulateur du sang. *Compt. Rend.* 124 (1897). 94.

DAVIS. Papaïn. *Pharmaceutical Journal* 3 ser. 24 (1893—4). 207.

DAVY, E. On some combinations of Platinum. *Phil. Trans. Roy. Soc.* 1820. 108.

Digitized by Google

DENIS. Mémoire sur le sang. 1859.

DESCHAMPS. *Dingler's Polytechnisches Journal* 1840. No. 78 p. 445.

DESMAZIÈRES. Recherches microscopiques et physiologiques sur le genre Mycoderma. *Ann. des Sciences Naturelles* t. x. 4 (1827). 4.

DETMER. Vergleichende Physiologie des Keimungsprozesses der Samen. Jena 1880.

DETMER. Über Fermentbildung und fermentative Prozesse. Jena 1884.

DICKINSON. Note on leech extract and its action on blood. *Journal of Physiology* XI. (1890). 566.

DONATH. Über den invertierenden Bestandteil der Hefe. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 8 (1875). 795.

DOTT. The digestive action of papaïn and pepsin compared. *Pharm. Journ.* ser. 3 24 (1893—4). 758.

DUBOIS, R. Sur le prétendu pouvoir digestif du liquide de l'urne des Népenthes. *Compt. Rend.* 111 (1890). 315.

DUBOURG. Recherches sur l'amylase de l'urine. *Thèse pour le Doctorat ès Sciences.* Paris 1889.

DUBRUNFAUT. Mémoire sur la saccharification. *Société d'agriculture de Paris.* 1823.

DUBRUNFAUT. Über Verwandlung des Stärkemehls in Zucker durch Malz. *Erdm. Journ. Tech. Chem.* IX. 156.

DUBRUNFAUT. Note sur quelques phénomènes rotatoires et sur quelques propriétés des sucres. *Compt. Rend.* 23 (1846). 40.

DUBRUNFAUT. Note sur la chaleur et le travail mécanique produits par la fermentation vineuse. *Compt. Rend.* 42 (1856). 945.

DUCLAUX. Chimie biologique. Paris 1883.

DUCLAUX. *Thèses présentées à la faculté des sciences.* Paris 1865.

DUCLAUX. Sur la saccharification. *Ann. de l'Institut Pasteur* 1895. 56, 170.

DUDDERIDGE. The manufacture of Pepsin and determination of its proteolytic power. *Pharm. Journ.* 3 ser. 23 (1892—3). 588.

DUMAS. Recherches sur la fermentation alcoolique. *Ann. de chim. et phys.* 5e ser. t. 3 (1874). 57.

EBSTEIN und GRÜTZNER. Über Pepsinbildung im Magen. *Pflüger's Archiv* 8 (1874). 122.

EDELBERG. Über die Wirkungen des Fibrinfermentes im Organismus. *Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol.* 12 (1880). 283.

EDKINS. The changes produced in casein by the action of pancreatic and rennet extracts. *Journ. of Physiology* XII. (1891). 193.

EDMUNDS. Note on Rennet and on the Coagulation of Milk. *Journ. of Physiology* XIX. (1896). 466.

EFFRONT. Sur des conditions chimiques de l'action des diastases. *Compt. Rend.* 115 (1892). 1324.

EFFRONT. Sur la formation de l'acide succinique et de la glycérine dans la fermentation alcoolique. *Compt. Rend.* 119 (1894). 169.

EFFRONT. Sur l'amylase. *Compt. Rend.* 120 (1895). 1281.

Digitized by Google

Effront. Sur un nouvel hydrate de carbone, la caroubine. *Compt. Rend.* 125 (1897). 38.

Effront. Sur une nouvelle enzyme hydrolytique „la caroubinase". *Compt. Rend.* 125 (1897). 116.

Effront. Sur la caroubinose. *Compt. Rend.* 125 (1897). 309.

Effront. Action de l'oxygène sur la levure de bière. *Compt. Rend.* 127 (1898). 326.

Effront. Les enzymes et leurs applications. Paris 1899.

Elfving. Studien über die Pollenkörner der Angiospermen. *Jenaische Zeit.* 13 (1879).

Emmerling. Butylalkoholische Gärung. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 30 (1897). 451.

Engelmann. *Hermann's Handbuch d. Physiologie.*

Etzinger. Über die Verdaulichkeit der leimgebenden Gewebe. *Zeit. f. Biologie* Bd. x. 92.

Eves, Miss. Some experiments on the liver ferment. *Journ. of Physiologie* v. (1884). 342.

Ewald. Versuche über die Wirksamkeit künstlicher Verdauungs-Präparate. *Zeitsch. f. klin. Med.* I. (1880). 231.

Fabroni. Mémoire sur les fermentations présenté à l'Academie de Florence 1787.

Fano. Das Verhalten des Peptons und Tryptons gegen Blut und Lymphe. *Du Bois-Reymond's Arch. Physiol.* 1881. 277.

Fermi. Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. *Cent. f. Bact.* 1891. Bd. 10. 401.

Fermi. Beitrag zum Studium der von den Mikroorganismen abgesonderten diastatischen und Inversionsfermente. *Cent. f. Bact.* 1892. Bd. XII. 714.

Fermi und Montesano. Über die Dekomposition des Amygdalins durch Mikroorganismen. *Cent. f. Bact.* 15 (1894). 722.

Fermi und Pernossi. Über die Enzyme. *Centr. f. Bact.* 1894. Bd. 15. 229.

Fernbach. Recherches sur la sucrase, diastase inversive du sucre de canne. *Thèse pour le Doctorat ès Sciences.* Paris 1890.

Fernbach. Sur le dosage de la sucrase. *Ann. de l'Inst. Pasteur* 3 (1889). 473, 531; 4 (1890). 1.

Fernbach. Sur l'invertine ou sucrase de la levure. *Ann. de l'Inst. Pasteur* 4 (1890). 641.

Fick. Über die Wirkungsart der Gerinnungsfermente. *Pflüger's Arch.* 45 (1889). 293.

Fischer, E. Synthese einer neuen Glucobiose. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 23 (1890). 3689.

Fischer, E.. Einfluſs der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 27 (1894). 2985, 3479 and 28 (1895). 1429.

Fischer. Spaltung von Trehalose. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* (1895). 1433.

Fischer, E. Über die Isomaltose. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 28 (1895). 3024.

Digitized by Google

FISCHER und LINDNER. Über die Enzyme von *Schizo-Saccharomyces octosporus* und *S. Marxianus* *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 28 (1895). 984.

FISCHER und LINDNER. Über die Enzyme einiger Hefen. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 28 (1895). 3034.

FISCHER und LINDNER. Verhalten der Enzyme gegen Melibiose, Rohrzucker und Maltose. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 28 (1895). 3035.

FISCHER und NIEBEL. Über das Verhalten der Polysaccharide gegen einige tierische Sekrete und Organe. *Chem. Centr.* 1896. 1, 499.

FITZ. On *Mucor racemosus* and alcoholic fermentation. *Soc. chim. de Berlin* Jan. and Feb. 1873.

FITZ. Über die Gärung des Glycerins. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 8 (1876). 1348.

FITZ. Über alkoholische Gärung. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 9 (1876). 1352.

FITZ. Über Schizomycetengärungen. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 10 (1877). 276.

FITZ. Über Spaltpilzgärungen. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 11 (1878). 1898; 12 (1879). 479; 13 (1880). 1309.

FLÜGGE. Mikroorganismen. 1896. III. Aufl. 202.

FOSTER. Notes on amylolytic ferments. *Journal of Anatomy and Physiology* 1 (1867). 107.

FRANKFURT. Zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des ruhenden Keims von Triticum vulgare. *Landw. Versuchsst.* 47 (1896). 449.

FRANKHAUSER. „What is diastase?“ *Ann. Agrin.* 12 (1885). 340.

FRANKLAND, P. F. and G. C. The Nitrifying Process and its specific ferment. *Phil. Trans. Roy. Soc. B.* 1890. 107.

FREDERICQ. La digestion des matières albuminoïdes chez quelques invertébrés. *Arch. de Zool. Expérimentale* 7 (1878). 39.

FREDERICQ. *Bull. de l'Akad. Roy. de Belgique* 46 1878.

FREDERICQ. Note sur le sang de l'Homard. *Bull. de l'Acad. Roy de Belgique* (2) 47 (1879). No. 4.

FREDERIKSE. Einiges über Fibrin und Fibrinogen. *Zeit. f. physiol. Chem.* 19 (1894). 143.

FREMY. Premiers essais sur la maturation des fruits. *Bull. de trav. de la Soc. de Pharm. de Paris* 26 (1840). 368.

FREMY. Mémoire sur la maturation des fruits. *Ann. chim. et phys.* (3) 24 (1848). 1.

FREMY. Recherches sur les fermentations. *Compt. Rend.* 75 (1872). 976 and 1060.

FRIEDBURG. The active principle of rennet, the so-called Chymosin. *Pharmaceutical Journal* Jan. 5 1889. 526.

GAD. Zur Lehre von der Fettresorption. *Archiv f. Anat. u. Physiol.* (1878). 181.

GAMGEE. Some old and new experiments on the Fibrin-ferment. *Journ. of Physiology* II (1879). 145.

GARDINER, W. On the changes in the gland cells of *Dionaea muscipula* during secretion. *Proc. Roy. Soc.* 36 (1884). 180.

Digitized by Google

GARDINER, W. On the phenomena accompanying stimulation of the gland cells in the tentacles of *Drosera dichotoma* *Proc. Roy. Soc.* 39 (1885). 229.

GARDINER, W. The Histology of the cell-wall, with special reference to the mode of connexion of cells. *Proc. Roy. Soc.* 62 (1897). 100.

GAY-LUSSAC. Sur l'analyse de l'alcool et de l'éther sulfurique. *Ann. de chimie* t. xcv. 318.

GAYON. Sur l'inversion et sur la fermentation alcoolique du sucre de canne par les moisissures. *Compt. Rend.* 86 (1878). 52.

GEDDES. On the coalescence of Amœboid cells into Plasmodia and on the so-called coagulation of Invertebrate Fluids. *Proc.Roy. Soc.* 30 (1879). 252.

GEDULD. *Wochenschrift für Brauerei* 8. 620; *Journ. Soc. Chem. Industry* 1892. 627.

GÉRARD. Présence dans le *Penicilium glaucum* d'un ferment agissant comme l'émulsine. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1893. 651 and *Journ. de Pharm.* (5) 28. 11.

GÉRARD. Sur une lipase végétale extraite du *Penicilium glaucum*. *Compt. Rend.* 124 (1897). 370.

GERBER. Maturation des fruits charnus. *Ann. de Sc. Nat.* Ser. VIII. T. 4. p. 1.

GERET und HAHN. Zum Nachweis des im Hefepreſssaft enthaltenen proteolytischen Enzyms. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 31 (1898). 202, 2385.

GILLESPIE. On the gastric digestion of proteids. *Journ. Anat. and Physiol.* 27 (1893). 195.

GOEBEL. *Pflanzenbiologische Schilderungen* 11 (1893). 186.

GOLDSCHMIDT. Zur Frage: Ist im Parotidenspeichel ein Ferment vorgebildet vorhanden oder nicht? *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 10 (1886). p. 273

GOLDSCHMIDT. Zur Frage: Enthält die Luft lebende auf Stärke verzuckernd wirkende Fermente? *Zeit. f. physiol. Chem.* 10 (1886). 299.

GOLDSCHMIDT. Zur Frage: Ist das Speichelferment ein vitales oder chemisches Ferment? *Zeit. f. physiol. Chem.* 10 (1886). 294.

GONNERMANN. *Chem. Zeitg.* 19 (1895). 1806.

v. GORUP-BESANEZ. Über das Vorkommen eines diastasischen und peptonisierenden Fermentes in den Wickensamen. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 7 (1874). 1478.

v. GORUP-BESANEZ. *Sitzber. d. phys. med. Soc. zu Erlangen* 1874. 75 und 76.

v. GORUP-BESANEZ und GRIMM. Peptonbildende Fermente im Pflanzenreich. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 8 (1875). 1510.

v. GORUP-BESANEZ und WILL. Fortgesetzte Beobachtungen über peptonbildende Fermente im Pflanzenreiche. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 9 (1876). 673.

v. GORUP-BESANEZ und WILL. *Sitzber. d. phys.-med. Soc. zu Erlangen* 1876.

GOUIRAND. Sur la présence d'une diastase dans les vins cassés. *Compt. Rend.* 120 (1895). 887.

GREEN, Reynolds. On certain points connected with the coagulation of the blood. *Journ. of Physiologie* VIII (1887). 354.

GREEN, Reynolds. On the changes in the proteids in the seed which accompany germination. *Phil. Trans.* 178 (1887). B. 39.

Digitized by Google

GREEN, Reynolds. On the germination of the Jerusalem Artichoke *(Helianthus tuberosus). Ann. of Botany* Vol. I. 1888.
GREEN, Reynolds. On the germination of the seeds of the Castor-oil plant *(Ricinus Communis). Proc. Roy. Soc.* 48 (1890). 370.
GREEN, Reynolds. On the occurrence of vegetable trypsin in the fruit of *Cucumis utilissimus. Annals of Botany* 6 (1892). 195.
GREEN, Reynolds. On vegetable ferments. *Ann. of Botany* 1893. Vol. 7, p. 83.
GREEN, Reynolds. On the Germination of the Pollen grain and the Nutrition of the Pollen tube. *Phil. Trans.* 185 (1894). B. 385.
GREEN, Reynolds. The action of light on diastase. *Phil. Trans.* B. Vol. 188 (1897). 167.
GREEN, Reynolds. The cell-membrane. *Science Progress* Vol. VI. 344.
GREEN, Reynolds. On the supposed alcohol-producing enzyme in yeast. *Ann. of Bot.* XI. (1897). 555.
GREEN, Reynolds. The alcohol-producing enzyme of yeast. *Annals of Botany* XII. (1898). 491.
GREENWOOD, Miss. On the digestive process in some Rhizopods. *Journ. of Physiology* VII. (1885). 253 and VIII. (1887). 263.
GREENWOOD, Miss. On digestion in Hydra. *Journ. of Physiology* IX. (1888). 317.
GREENWOOD, Miss. On the Food Vacuoles in Infusoria. *Phil. Trans.* 185 (1894). B. 355.
GREENWOOD (Miss) and SAUNDERS (Miss). On the role of acid in protozoan digestion. *Journ. of Physiol.* XVI. (1894). 441.
GRIESSMEYER. Über das Verhalten von Stärke und Dextrin gegen Jod und Gerbsäure. *Liebig's Annalen der Chim. u. Pharm.* 160 (1871). 40.
GRIFFITHS. Physiology of the Invertebrata. London, Reeve and Co. 1892.
GRIS. Recherches sur la germination. *Ann. des Sc. Nat. — Botanique* (5) 2 (1865). 5.
GRÜSS. Über den Eintritt von Diastase in das Endosperm. *Ber. d. deut. bot. Gesell.* 11 (1893). 286.
GRÜSS. Über die Einwirkung der Diastase auf Reservecellulose. *Ber. d. deut. bot. Gesell.* 12 (1894). (60).
GRÜSS. Über das Verhalten des diastatischen Enzyms in der Keimpflanze. *Pringsheim's Jahrb.* 26 3 (1894). 379.
GRÜSS. Die Diastase im Pflanzenkörper. *Ber. d. deut. bot. Gesell.* 13 (1895). 2.
GRÜSS. *Wochenschr. f. Brauerei* (1895). 1257.
GRÜSS. *Bibliotheca bot.* (1896). Hft. 39.
GRÜSS. *Landw. Jahrb.* (1896). Bd. 25.
GRÜSS. Über die Sekretion des Schildchens. *Pringsheim's Jahrb.* 30 (1897). 645.
GRÜTZNER. Notizen über einige ungeformte Fermente des Säugetierorganismus. *Pflüger's Archiv* 12 (1876). 302 and 14 (1877). 285.
GUIGNARD. Sur la localisation dans les plantes des principes qui fournissent l'acide cyanhydrique. *Compt. Rend.* 110 (1890). 477.

Digitized by Google

GUIGNARD. Sur la localisation dans les amandes et le lauriercerise des principes qui fournissent l'acide cyanhydrique. *Journal de Botanique* 4 (1890). 3.

GUIGNARD. Sur la localisation des principes actifs des crucifères. *Journal de Botanique* 4 (1890). 385, 412, 435 and *Compt. Rend.* 111 (1890), 249, 920.

GUIGNARD. Recherches sur la localisation des principes actifs chez les Capparidées, Tropéolées, Limnanthés, Résédées. *Journal de Botanique* (1893). Nos 19, 20, 22, 23, 24.

GUIGNARD. Recherches sur certains principes actifs encore inconnus chez les Papayacées. *Journal de Botanique* 8 (1894). 67, 85.

GUIGNARD. Sur quelques propriétés chimiques de la Myrosine. *Bull Soc. Bot. de France* (3) 1 (1894). 418.

GUNNING. Untersuchungen über den Einfluſs der Hefen auf Zuckerlösung. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 5 (1872). 821.

DE HAAS und TOLLENS. Untersuchungen über Pektinstoffe. *Liebig's Annalen* 286 (1895). 278.

HABERLANDT. Die Kleberschicht des Gras-Endospermes als Diastase ausscheidendes Drüsengewebe. *Ber. d. deut. bot. Gesell.* 8, 40.

HAHN. Das proteolytische Enzym des Hefepresssaftes. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 31 (1898). 200.

HALLIBURTON. Physiological Chemistry.

HALLIBURTON. On the blood of decapod Crustacea. *Journ. of Physiology* VI. (1885). 183.

HALLIBURTON. On Muscle-plasma. *Journ. of Physiology* VIII. (1887). 159.

HALLIBURTON. On the nature of fibrin ferment. *Journ. of Physiology* IX. (1888). 265.

HALLIBURTON. Nucleo-proteids. *Journ. of Physiology* XVIII. (1895). 306.

HALLIBURTON and BRODIE. Nucleo-Albumins and Intravascular Coagulation. *Journ. of Physiology* XVII. (1894). 135.

HALLIBURTON and BRODIE. Action of pancreatic juice on milk. *Journ. of Physiology* XX. (1896). 97.

HALLIER. Gärungserscheinungen (1867). 39.

HAMBURGER. Vergleichende Untersuchung über die Einwirkung des Speichels, des Pankreas- und Darmsaftes, sowie des Blutes auf Stärkekleister. *Pflüger's Archiv* 60 (1895). 543.

HAMMARSTEN. Über die Milchgerinnung und die dabei wirkenden Fermente der Magenschleimhaut. *Raly's Berichte* II. (1872). 118.

HAMMARSTEN. Über den chemischon Verlauf bei der Gerinnung des Kaseïns mit Lab. *Maly's Berichte* IV. (1874). 135.

HAMMARSTEN. Zur Kenntnis des Kaseïns und der Wirkung des Labfermentes. Upsala 1877.

HAMMARSTEN. Zur Kenntnis des Kaseïns und der Wirkung des Labfermentes. *Maly's Berichte* VII. (1877). 166.

HAMMARSTEN, Zur Lehre von der Faserstoffgerinnung. *Pflüger's Arch.* 14 (1877). 211.

Digitized by Google

HAMMARSTEN. Über das Paraglobulin. *Pflüger's Archiv* 17 (1878). 413; 18 (1878). 38.

HAMMARSTEN. Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung. *Nov. Acta Reg. Soc. Scientiar. Upsal.* Ser. 10. Vol. 10. Separatabdruck, Upsala 1878.

HAMMARSTEN. Über das Fibrinogen. *Pflüger's Arch.* 19 (1878). 563.

HAMMARSTEN. Über den Faserstoff und seine Entstehung aus dem Fibrinogen. *Pflüger's Archiv* 30 (1883). 457.

HAMMARSTEN. Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung. *Zeit. f physiol. Chem.* 22 (1896). 333.

HANRIOT. Sur un nouveau ferment du sang. *Compt. Rend.* 123 (1896). 753.

HANRIOT. Sur la non-identité des lipases d'origine différente. *Compt. Rend.* 124 (1897). 778.

HANRIOT et CAMUS. Sur le dosage de la lipase. *Compt. Rend.* 124 (1897). 235.

HANSEN, A. Über Fermente und Enzyme. *Arbeit. des bot. Inst. in Würzburg* III. (1887). 251, and *Bot. Zeit.* (1886). 137.

HANSEN. Die Verflüssigung der Gelatine durch Schimmelpilze. *Flora* 72 (1889). 88.

HANSTEEN. Über die Ursachen der Entleerung der Reservestoffe aus Samen. *Flora* 79 (1894). 419.

HARCOURT, A. Vernon. On the observation of the course of chemical change. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 20, 460.

HARDY. The blood corpuscles of the Crustacea, together with a suggestion as to the origin of the Crustacean fibrin-ferment. *Journ. of Physiology* XIII. (1892). 165.

HARLEY. The behaviour of saccharine matter in the blood. *Journ. of Physiology* XII. (1891). 391.

HARRIS and GOW. Ferment actions of the pancreas in different animals. *Journ. of Physiology* XIII. (1892). 469.

HARTIG, R. Lehrb. d. Baumkrankheiten II. Berlin 1889.

HAYDUCK. *Zeit. Spirit Ind.* (1881).

HAYEM. Observation à l'occasion du travail de M. Arthus sur le dosage comparatif du fibrinogène et de la fibrine. *Compt. Rend. Soc. Biol.* S. X. 1 (1894). 309.

HEIDENHAIN. Beiträge zur Kenntnis des Pankreas. *Pflüger's Archiv* 10 (1875). 557.

HELBING and PASSMORE. *Pharmacological Record*, July 1893.

HELWES. Über Labferment im menschlichen Harn. *Pflüger's Archiv* 43 (1888). 384.

HENIGER. Recherches sur les peptones. *Compt. Rend.* 86 (1878). 1464.

HENNEBERG und STOHMANN. Über die Bedeutung der Cellulose-Gärung für die Ernährung der Tiere. *Zeit. f. Biol.* XXI. (1885). 613.

HÉRISSEY. Sur la présence de l'émulsine dans les lichens. *Bull. de la Soc. Mycol. de France* 15 (1898).

HÉRY (362). *Ann. de Micrographie* IV. 13.

HERZFELD (50). Über Maltodextrin. Halle 1879.

Digitized by Google

Herzfeld. Über die Einwirkung der Diastase auf Stärkekleister. *Ber. d. d. chem. Gesell.* 12 (1879). 2120.

Hewson (248). The works of Wm. Hewson, F.R.S., edited with an introduction and notes by G. Gulliver, F.R.S. London, printed for the Sydenham Society, 1846.

Hiepe. On some products of starch transformation. *Country Brewer's Gazette* (1893). 732; (1894). 12, 37, 68, 99.

Hill, A. Croft. Reversible Zymohydrolysis. *Journ. Chem. Soc. Trans.* (1898). 634.

Hjort. Neue eiweißverdauende Enzyme. *Cent. f. Physiol.* x. (1896). 192.

Hoffmann. Über das Schicksal einiger Fermente im Organismus. *Pflüger's Archiv* 41 (1887). 148.

Hofmeister. Über die chemische Struktur des Collagens. *Zeit. f. physiol. Chem.* 2, 299.

Hofmeister. *Arch. f. Tierheilkunde* Bd. vii. (1881). 169; Bd. xi. Hfte 1 and 2.

Hooker. The carnivorous habits of plants. *Brit. Assoc. Reports* 1874 (Belfast). 102.

Hoppe-Seyler. *Physiol. Chem.* (1877).

Hoppe-Seyler. Über Unterschiede im chemischen Bau und der Verdauung höherer und niederer Tiere. *Pflüger's Archiv* 14 (1877). 395.

Hoppe-Seyler. Gärung der Cellulose. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* xvi. (1883). 122.

Hüfner. Untersuchungen über ungeformte Fermente und ihre Wirkungen. *Journ. f. prakt. Chem.* N. F. Bd. 5 (1872). 372; 10 (1874). 1; 11 (1875). 43, 194.

Hüfner. Recherche sur le ferment non organisé. *Bull. de la Soc. Chim. de Paris* (1877).

Huie, Miss. Changes in the Cell-organs of *Drosera rotundifolia* produced by feeding with Egg-albumen. *Quart. Journ. Mic. Sc.* 39 (1897). 387.

Jacobson. Über ungeformte Fermente. *Inaug.-Diss.* Berlin 1891.

Jacobson. Untersuchungen über lösliche Fermente. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 16 (1892). 340.

Jacquemart. Note sur la fermentation urinaire. *Ann. Chim. et Phys.* 3 ser. vii. (1843). 149.

de Jager. Erklärungsversuch über die Wirkungsart der ungeformten Fermente. *Virchow's Archiv* 121, 182.

Jalowetz. *Chem. Zeitg.* (1895). 19, 2003.

Johansen. Sur la localisation de l'émulsine dans les Amandes. *Ann. Sci. Nat. (Bot.)* 7 ser. 6 (1887). 118.

Jörgensen. Micro-organisms and fermentation. Trans. by Miller and Lenholm. London 1893.

Katz. *Sitzungsb. d. Sächs. Ges. d. Wiss. Leipzig* (1896). 513.

Kaufmann. Contribution à l'étude de ferment glucosique du foie. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 9, 1 (1889). 600.

Kean (92). On Rhizopus nigricans. *Bot. Gazette* xv. 173 (1890).

Digitized by Google

KELLNER, MORI und NAGAOKO (113). Beiträge zur Kenntnis der invertierenden Fermente. *Zeit. f. physiol. Chem.* 14 (1890). 297.

KIRCHHOFF. Über die Zuckerbildung beim Malzen des Getreides. *Schweig's Journ.* 14 (1815). 389.

KJELDAHL. I. Recherches sur les ferments producteurs de sucre. II. Recherches sur la ptyaline. *Meddelelser fra Carlsberg laboratoriet.* Vol. 1 (1878). 82.

KJELDAHL. *Compt. rend. des travaux du Laboratoire de Carlsberg* (1879). 129 and (1881). 189.

KLUG. Untersuchungen über Pepsinverdauung. *Pflüger's Archiv* 60 (1895). 43.

v. KNIERIEM. Über die Verwertung der Cellulose im tierischen Organismus. *Zeit. f. Biol.* XXI. (1885). 67.

v. KNIERIEM und MAYER. Über die Ursache der Essiggärung. *Landwirt. Versuchsstat.* 16 (1873). 305.

KOCH. *Jahrb. d. Gärungsorg.* (1890). 171.

KOCH und HOSÄUS. Das Verhalten der Hefen gegen Glykogen. *Chem. Centr.* (1894). 2, 869.

KOHL. Über Assimilationsenergie und Spaltöffnungsmechanik. *Bot. Centr.* 64 (1895). 109.

KOSMANN. Recherches chimiques sur les ferments contenus dans les végétaux. *Bull. de la Soc. Chim. de Paris* XXVII. (1877). 257.

KRABBE. Untersuchungen über das Diastaseferment mit spezieller Berücksichtigung seiner Wirkung auf Stärkekörner innerhalb der Pflanze. *Pringsheim's Jahrb.* 21 (1890). 520.

KRAUCH. Beiträge zur Kenntnis der ungeformten Fermente im Pflanzenreich. *Landwirtsch. Versuchsstat.* XVIII. (1879).

KRAUCH. Über Pepton bildende Fermente in den Pflanzen. *Landw. Versuchsst.* 27 (1882). 383.

KRAWKOW: Eine allgemeine Methode zur Darstellung unorganischer Fermente in reinen Wasseraufgüssen.. *Journ. d. russ. phys.-chem. Gesell.* 1 (1887). 387; and *Ber. d. d. chem. Gesell.* Referatband 1887. 735.

KRÖBER. *Zeit. ges. Brauwes.* (1895). 18, 324, 334.

KRUKENBERG. Über ein peptonisches Enzym im Plasmodium der Myxomyceten und im Eidotter vom Huhne. *Maly's Jahresb. Thiersch.* 9 (1879). 270.

KRUKENBERG. *Kühne's Untersuchungen* II. (1882). 4, 13.

KRUKENBERG. Über ein peptisches Enzym im Plasmodium der Myxomyceten. *Kühne's Untersuchungen* II. (1882). 273.

KÜHNE. Über die Verdauung der Eiweißstoffe durch den Pankreassaft. *Virchow's Archiv* 39 (1867). 130.

KÜHNE. Über das Verhalten verschiedener organisierter und ungeformter Fermente. *Verhandl. d. naturhist.-med. Ver. Heidlbg.* 1 (1876). 190.

KÜHNE. Über das Trypsin. *Verhandl. d. naturhist.-med. Ver. Heidlbg.* N. F. Bd. I. (1876). 194 and Bd. III. (1886). 463.

KÜHNE. Erfahrungen und Bemerkungen über Enzyme und Fermente. *Phgsiologisches Institut Heidelberg* (1878).

KÜHNE. Vereinfachte Darstellung des Trypsins. *Verhandl. d. naturhist.-med. Ver. Heidlbg.* 3 (1886). 463.

Digitized by Google

KÜHNE und CHITTENDEN. Über die nächsten Spaltungsprodukte der Eiweißkörper. *Zeit. f. Biol.* 19 (1883). 184.

KÜHNE und CHITTENDEN. Über Albumosen. *Zeit. f. Biol.* 20 (1884). 11.

KÜHNE und CHITTENDEN. Über die Peptone. *Zeit. f. Biol.* 22 (1886). 423.

KÜHNE und LEA, Sheridan (375). Über die Absonderung des Pankreas. *Verhandlg. naturhist.-med. Vereins Heidelberg* 1 (1877). 445.

KÜLZ und FRERICHS. Über den Einfluß der Unterbindung des Ductus choledochus auf den Glykogengehalt der Leber. *Pflüger's Archiv* 13 (1876). 460.

KÜLZ und VOGEL. Welche Zuckerarten entstehen bei dem durch tierische Fermente bewirkten Abbau der Stärke und des Glykogens? *Zeit. f. Biol.* 31 (1895). 108.

KÜTZING. Organische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter. *Erdm. Journ. f. prakt. Chem.* XI. (1837). 381.

LABORDE. Sur la consommation du Maltose par une moisissure nouvelle, l'*Eurotiopsis Gayot*. Ast. *Compt. Rend. Soc. Biol.* S. x. 2 (1895). 472.

LABORDE. Sur l'oxydase du *Botrytis cinerea*. *Compt. Rend.* 126 (1898). 536.

LAFAR. Technical Mycology. Eng. Trans. by Salter. London 1898.

LAILLER. Note sur la fermentation ammoniacale de l'urine. *Compt. Rend.* 78 (1874). 361.

LANGLEY. On the destruction of ferments in the alimentary canal. *Journal of Physiology* III. (1881). 246.

LANGLEY. On the histology of the mammalian gastric glands. *Journal of Physiology* III. (1881). 269.

LANGLEY and EDKINS. Pepsinogen and Pepsin. *Journal of Physiology* VII. (1886). 371.

LANGLEY and EVES. On certain conditions which influence the amylolytic action of Saliva. *Journal of Physiology* IV. (1882). 18.

DE LATOUR, Cagniard. Mémoire sur la Fermentation vineuse. *Ann. de chim. et phys.* 2e sér. t. LXVIII. (1838). 206.

LAVOISIER. Éléments de Chimie.

LEA, Sheridan. On the action of the Rennet Ferment contained in the seeds of *Withania coagulans*. *Journal of Physiology* v. (1883) VI. and *Proc. Roy. Soc.* 36 (1883). 55.

LEA, Sheridan. Some notes on the isolation of a soluble ureaferment from the *Torula ureae*. *Journal of Physiology* VI. (1885). 136.

LEA, Sheridan. A comparative study of artificial and natural Digestions. *Journal of Physiology* XI. (1890). 226.

LEA, Sheridan, and GREEN, Reynolds. Some notes on the Fibrinferment. *Journal of Physiology* IV. (1883). 380.

LEBER. Bowman Lecture 1892. *Brit. Med. Journ.* 1643, 1357.

LECHARTIER et BELLAMY. De la fermentation des fruits. *Comptes Rendus* 81 (1875). 1129.

LEIDY. Freshwater Rhizopods of N. America.

LEMERY. Cours de chemie. 1675.

Digitized by Google

Lepine. Sur la présence normale dans le chyle d'un ferment destructeur du sucre. *Compt. Rend.* 110 (1890). 742.

Lepine. Sur la production du ferment glycolytique. *Compt. Rend.* 120 (1895). 139.

Lepine et Barral. Sur le pouvoir glycolytique du sang et du chyle. *Compt. Rend.* 110 (1890). 1314.

Lepine et Barral. Sur la destruction du sucre dans le sang *in vitro*. *Compt. Rend.* 112 (1891). 146.

Lepine et Barral. Sur l'isolement du ferment glycolytique du sang. *Compt. Rend.* 112 (1891). 411.

Lepine et Barral. Sur les variations des pouvoirs glycolytique et saccharifiant du sang, et sur la localisation du ferment saccharifiant dans le sérum. *Compt. Rend.* 113 (1891). 1014.

Lepinois. Note sur les ferments oxydants de l'Aconit et de la Belladone. *Journ. de Pharm.* (6) 9 (1899). 49.

Leuchs. Wirkung des Speichels auf Stärke. *Poggend. Annal.* xxii. (1831). 623.

Leuchs. Über die Verzuckerung des Stärkmehls durch Speichel. *Kastner. Archiv Chemie* iii. (1831). 105.

Lévy. De la fermentation alcoolique des topinambours. *Compt. Rend.* 116 (1893). 1381.

Libavius. Alchymia. 1595.

Liborius. Beiträge zur Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien. *Zeitsch. f. Hygiene* 1886. Bd. i. 156.

Liebig. Sur les Phénomènes de la Fermentation et de la Putréfaction, et sur les causes qui les provoquent. *Ann. de chim. et de phys.* 2e sér. t. lxxi. (1839). 147.

Liebig. Über die Erscheinungen der Gärung, Fäulnis und Verwesung und ihre Ursachen. *Ann. d. Chem. u. Pharm.* 30 (1839). 250, 363.

Liebig. *Chemische Briefe* 1865. 159.

Liebig. Über die Gärung und die Quelle der Muskelkraft. *Ann. d. Chem. u. Pharm.* 153 (1870). 1, 137.

Liebig. Sur la fermentation. *Ann. d. chim. et de phys.* (4) 23 (1871). 7.

Liebig et Woehler. Sur la formation de l'huile d'amandes amères. *Ann. de chim. et phys.* 64 (1837). 185.

Lindberger. Beiträge zur Kenntnis der Trypsinverdauung bei Gegenwart von freien Säuren. *Maly's Berichte* 13 (1884). 280.

Lindet. Sur l'oxydation du tanin de la pomme à cidre. *Compt. Rend.* 120 (1895). 370.

Ling and Baker. The action of diastase on starch. *Journal of the Chemical Society. Trans.* 1895. 702; *Trans.* 1895. 739; *Trans.* 1897. 508.

Linnæus. Pinguicula Vulgaris. *Flora Laponica* 1737. page 10.

Lintner, C. J. Studien über Diastase. *Zeit. f. d. ges. Brauwesen* 1886. 474.

Lintner, C. J.. Studien über Diastase. *Journ. f. prakt. Chem.* (2) 34 (1886). 378; 36 (1887). 481.

Lintner, C. J. Über die chemische Natur der vegetabilischen Diastase. *Pflüger's Arch.* (1881). 205.

Digitized by Google

LINTNER, C. J.. Über das Vorkommen von Isomaltose im Biere und in der Würze. *Zeit. f. d. ges. Brauwesen* 1891. 281.

LINTNER, C. J. Über Isomaltose und deren Bedeutung für die Brauerei. *Zeit. f. d. ges. Brauwesen* 1892. 6.

LINTNER, C. J. Über die Vergärbarkeit der Isomaltose. *Zeit. f. d. ges. Brauwes.* 1892. 106.

LINTNER, C. J. Über die Einwirkung von Diastase auf Isomaltose. *Zeit. f. d. ges. Brauwesen* (1894). 378 und (1895). 173 und *Chem. Centr.* 1895. 1, 91.

LINTNER Über die Invertierung von Maltose und Isomaltose durch Hefe. *Chem. Centr.* 1895. 1, 271.

LINTNER und DÜLL. Versuche zu Gewinnung der Isomaltose aus den Produkten der Stärkeumwandlung durch Diastase. *Zeit. f. angew. Chem.* 1892. 363. auch *Zeit. f. d. ges. Brauwesen* 1892. 145.

LINTNER und DÜLL. Über den Abbau der Stärke unter dem Einflusse der Diastasewirkung. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 16 (1893). 2533.

LINTNER und DÜLL. On a second achroodextrin formed by the action of diastase on starch. *Zeit. f. d. ges. Brauwesen* 1894. 339.

LINTNER und ECKHARDT. Studien über Diastase. *Zeit. f. das ges. Brauwes.* 1889. 389 und *Journ. f. pr. Chem.* [2] 41 (1890). 91.

LINTNER und KRÖBER. Verschiedenheit der Hefeglukase von Maisglukase und Invertase. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 28 (1895). 1050.

LINZ. Beiträge zur Physiologie der Keimung von *Zea Mais* L. *Pringsheim's Jahrb.* 29 (1896). 267.

LOEW). Über die chemische Natur der ungeformten Fermente. *Pflüger's Archiv* 27 (1882). 203 and 36 (1885). 170.

LUBAVIN (183). Über die künstliche Pepsin-Verdauung des Kaseïns und die Einwirkung von Wasser auf Eiweissubstanzen. *Hoppe-Seyler's med.-chem. Untersuch.* Hf. IV. (1871). S. 463.

DE LUCA. Recherches chimiques tendant à démontrer la production de l'alcool dans les feuilles, les fleurs et les fruits de certaines plantes. *Ann. de Sc. Nat.* (6) 6 (1878).

LUDWIG. Über das Chromogen des *Boletus cyanescens*, und anderer auf frischem Bruche blau werdender Pilze. *Arch. der Pharm.* (2) CXLIX. 1872. 107.

LUTZ. Amygdalin und Emulsin in den Samen gewisser Pomaceen. *Rep. der Pharm.* 1897. 312.

MACALLUM. Contributions to the Morphology and Physiology of the Cell. *Trans. Canadian Inst.* 1 (1890). 247.

MACALLUM. On the distribution of assimilated iron compounds in animal and vegetable cells. *Quart. Journ. Mic. Sc.* 38 (1895). 229.

MACALLUM. On the detection and localisation of phosphorus in animal and vegetable tissues. *Proc. Roy. Soc.* 63 (1898). 467.

MALY. Über die chemische Zusammensetzung und physiologische Bedeutung der Peptone. *Pflüger's Archiv* 9 (1874). 592.

MANGIN. Étude historique et critique sur la présence des composés pectiques dans les tissus des végétaux. *Journ. de Botanique* 5 (1891). 400, 440.

Digitized by Google

Mangin. Propriétés et réactions des composés pectiques. *Morot's Journ. de Botanique* 6 (1892). 206, 235, 363.

Mangin. Recherches sur les composés pectiques. *Journ. de Botanique* 7 (1893). 37, 121, 325.

Marcano. Sur la fermentation peptonique. *Compt. Rend.* 99 (1884). 811 and 107 (1888). 117.

Marcano. *Bulletin of Pharmacy* v. (1891). 77.

Martin, S. H. C. Papaïn-Digestion. *Journ. of Physiology* v. (1884). 213.

Martin, S. H. C. The nature of Papaïn and its action on vegetable proteids. *Journ. of Physiology* vi. (1885). 336.

Martinand. Action de l'air sur le moût de raisin et sur le vin. *Compt. Rend.* 121 (1895). 502.

Martinand. Sur l'oxydation et la casse des vins. *Compt. Rend.* 124 (1897). 512.

Mathieu et Hallopeau. *Arch. de Méd. expér.* No. 3. 1893.

Mayer, Ad. Die Lehre von den chem. Fermenten. Heidelberg 1882.

Mays, Karl. Über die Wirkung von Trypsin in Säuren und von Pepsin und Trypsin aufeinander. *Unters. a. d. physiol. Inst. d. Univ. Heidelberg.* 1880. 378.

Meissner. *Zt. f. nat. Med.* vii. 1; viii. 280; x. 1; xii. 46; xiv. 303, Referat von Lehmann im *Biol. Centr.* 4 (1884). 407.

v. Mering. Über den Einfluſs diastatischer Fermente auf Stärke, Dextrin und Maltose. *Zeit. f. physiol. Chem.* v. (1881). 185.

Metschnikoff. Untersuchungen über die intracellulare Verdauung bei wirbellosen Tieren. *Arbeit. a. d. Zool. Instit. Wien* 5 (1883). 141.

Metschnikoff. Recherches sur la digestion intracellulaire. *Ann. de l'Inst. Pasteur* 3 (1889). 25.

Metzler. Beiträge zur Verdauung des Leims. Gieſsen 1860. *Schmidt's Jahrb.* Bd. 110, 153.

Meyen. Pflanzenphysiologie 3e v. 455.

Meyer, A. Über Stärkekörner, welche sich mit Jod rot färben. *Ber. d. deut. bot. Gesell.* 4 (1886). 337.

Meyer, A. Zu der Abhandlung von Krabbe „Untersuchungen über Diastase". *Ber. d. d. bot. Gesell.* 1891. 9, 238.

Meyer, A. Untersuchungen über die Stärkekörner. Jena 1885.

Mialhe. De la digestion et de l'assimilation de matières sucrées et amyloïdes. *Comptes Rend.* 20 (1845). 954, 1485.

Mialhe. Mémoire sur la digestion et l'assimilation des matières amyloïdes et sucrées. 1846.

Mierau. *Chem. Zeit.* 17. 1283.

Miguel. Sur le ferment soluble de l'urée. *Compt. Rend.* 111 (1890). 397.

Mitscherlich. Chemische Zersetzung und Verbindung vermittelst Kontaktsubstanzen. *Poggendorf's Ann.* lv. 225.

Mittelmeier. Beiträge zur Kenntnis der diastatischen Zersetzung der Stärke. *Chem. Centr.* 1895. ii. 163.

Miuria Inversion des Rohrzuckers. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* (1895). 623.

Digitized by Google

MIURA. Ist der Dünndarm imstande, Rohrzucker zu invertieren? *Zeit. Biol.* 32 (1865). 266.

MONOYER. *Thèse de médecine.* Strasbourg 1862.

MORITZ and GLENDINNING. Note on diastatic action. *Journ. Chem. Soc.* 1892. 688.

MORRIS, G. H.. Glukase. *Trans. Inst. Brew.* 6 (1894). 132.

MORRIS and WELLS. Diastase in yeast. *Trans. Instit. Brewing* v. 6.

MÜLLER. *Ann. Agrin.* 12 (1885). 481.

MÜLLER. *Landwirt. Versuchsstat.* 16. 273.

MÜLLER. Über Konservierung und Konzentrierung des menschlichen Harns. *Journ. f. prakt. Chem.* 81 (1860). 467.

MÜLLER und EBSTEIN. Über den Einfluſs der Säuren und Alkalien auf das Leberferment. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 8 (1875). 679.

MÜLLER und SCHWANN. Versuche über die künstliche Verdauung des geronnenen Eiweiſses. *Müller's Archiv* 1836. 66.

MÜLLER et SCHWANN. Experiences sur la digestion artificielle. *Ann. Sci. Nat. Zool.* (2) 7 (1837). 313.

MÜNTZ. Sur la germination des graines oléagineuses. *Annales de chim. et phys.* (4) 22 (1871). 472.

MÜNTZ. Recherches sur la fermentation alcoolique intracellulaire des végétaux. *Compt. Rend.* 86 (1878). 49. and *Ann. de chim. et phys.* (5) 13 (1878). 543.

MÜNTZ. *Boussingault Agronomie* VI. 1878.

MÜNTZ et MARCANO (358). Sur la formation des terres nitrées dans les régions tropicales. *Ann. chim. et phys.* (6) 10 (1887). 563.

MUSCULUS. Remarques sur la transformation de la matière amylacée en glucose et dextrine. *Compt. Rend.* 50 (1860). 785.

MUSCULUS. Nouvelle note sur la transformation de l'amidon en dextrine et glucose. *Compt. Rend.* 54 (1862). 194.

MUSCULUS. De la dextrine. *Ann. chim. et phys.* (4) 6 (1865). 177.

MUSCULUS. Sur un papier réactif de l'urée. *Compt. Rend.* 87 (1874). 132.

MUSCULUS. Sur le ferment de l'urée. *Compt. Rend.* 82 (1876). 334.

MUSCULUS und GRUBER. Ein Beitrag zur Chemie der Stärke. *Zeit. f. physiol. Chem.* II. (1878) 177.

MUSCULUS et GRUBER. Sur l'amidon. *Compt. Rend.* 86 (1878). 1459 und *Bull. Soc. Chim.* 30 (1878). 54.

MUSCULUS und v. MERING. Über die Umwandlung von Stärke und Glykogen durch Diastase, Speichel, Pankreas- und Leberferment. *Zeit. f. physiol. Chem.* 2 (1878). 403.

MUSCULUS et v. MERING. De l'action de la diastase de la saliva et du suc panc. sur l'amidon et sur le glycogène. *Bull. de la Soc. Chim. de Paris* T. XXXI. Nr. 3. 105.

MUSSI. Cradina, a proteolytic enzyme in the Fig *(Ficus Carica). L'Orosi* Nov. 1890. 364. Abs. in *Pharm. Journ.* 3 ser. 21 (1800—1). 560.

v. NAEGELI, C.. Theorie der Gärung. München 1897.

NÄGELI, W. Beiträge zur Kenntnis der Stärkegruppe. Leipzig 1874.

Digitized by Google

NASSE. Untersuchungen über die ungeformten Fermente. *Pflüger's Arch.* 11. (1875). 138.

NASSE. Bemerkungen zur Physiologie der Kohlehydrate. *Pflüger's Archiv* 14 (1877). 477.

NASSE. Fermentprozesse unter dem Einfluſs von Gasen. *Pflüger's Archiv* 15 (1877). 471.

NASSE. Zur Anat. und Physiologie der quergestreiften Muskelsubstanz. Leipzig 1882.

NASSE und FRAMM. Bemerkungen zur Glykolyse. *Pflüger's Archiv* 63 (1896). 203.

NENCKI. Über die Zersetzung der Gelatine und des Eiweiſses bei der Fäulnis mit Pankreas. Bern 1876. Abs. in *Jahresber. f. Tierchemie* 6, 31.

NENCKI. Zur Kenntnis der pankreatischen Verdauungsprodukte des Eiweiſses. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 26 (1895). 560.

NEUMEISTER. Zur Kenntnis der Albumosen. *Zeit. f. Biol.* 23 (1887). 381.

NEUMEISTER. Bemerkungen zur Chemie der Albumosen und Peptone. *Zeit. f. Biol.* 24 (1888). 267.

NEUMEISTER. Über die nächste Einwirkung gespannter Wasserdämpfe auf Proteïne. *Zeit. f. Biol.* 26 (1890). 57.

NEUMEISTER. Über die Reaktionen der Albumosen und Peptone. *Zeit. f. Biol.* 26 (1890). 324.

NEUMEISTER. Physiol. Chem. 1893.

NEUMEISTER. Über das Vorkommen und die Bedeutung eines eiweiſslösenden Enzyms in jugendlichen Pflanzen. *Zeit. Biol.* 30 (1894). 447.

NEUMEISTER. Bemerkungen zu Eduard Buchner's Mitteilungen über „Zymase“. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 30 (1897). 2963.

ONIMUS. Phénomènes consécutifs à la dialyse des cellules de la levure de bière. *Compt. Rend.* 119 (1894). 479.

OSBORNE, T. B. The Chemical Nature of diastase. *Journ. Amer. Chem. Soc.* 17 (1895). 587.

OSBORNE and CAMPBELL. The Chemical Nature of diastase. *Journ. Amer. Chem. Soc.* 18 (1896). 536.

OSBORNE and CAMPBELL. The proteids of malt. *Journ. Amer. Chem. Soc.* 18 (1896). 542.

OSTWALD. *Ber. d. Sächs. Ges. d. Wiss.* 1894. 337.

O'SULLIVAN, C. On the transformation-products of Starch. *Jouru. Chem. Soc. Trans.* 1872. 579 and 1879. 770.

O'SULLIVAN, C., and TOMPSON. Invertase, a contribution to the history of an enzyme or unorganised ferment. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 57 (1890). 834.

O'SULLIVAN, J. The influence of germination upon the constituents of barley. *Trans. Laboratory Club* III. 5 1890.

PASTEUR. Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Ann. de chim. et de phys.* 3e ser. T. 52 (1858). 407.

PASTEUR. De l'origine des ferments. *Compt. Rend.* 50 (1860). 849.

Digitized by Google

PASTEUR. Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Ann. de chim. et phys.* 3e ser. T. 58 (1860). 323.

PASTEUR. Sur les ferments. *Bull. Soc. Chim.* 1861. 61.

PASTEUR. Sur la fermentation visqueuse et la fermentation butyrique. *Bull. Soc. Chim.* 1861. 30.

PASTEUR. Note sur un mémoire de M. Liebig, relatif aux fermentations. *Ann. chim. et phys.* 4 ser. T. 25 (1872). 145.

PASTEUR. Faits nouveaux pour servir à la connaissance de la théorie des fermentations proprement dites. *Compt. Rend.* 75 (1872). 784.

PASTEUR. Sur la production de l'alcool par les fruits. *Compt. Rend.* 75 (1872). 1054.

PAUTZ und VOGEL. Über die Einwirkung der Magen- und Darmschleimhaut auf einige Biosen und auf Raffinose. *Zeit. Biol.* 32 (1895). 304.

PAVY. Physiology of the Carbohydrates. London 1894.

PAVY. Hepatic Glycogenesis. *Journal of Physiology* XXII. (1898). 391.

PAWLEWSKI. Über die Unsicherheit der Guajak-Reaktion auf wirksame Diastase. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 30 (1897). 1313.

PAYEN. Analyse de la partie corticale de l'Ailanthus glandulosa. *Ann. de chim. et phys.* (2) 26 (1824). 329.

PAYEN. *Recueil des savants étrangers* (9) 1846), 148.

PAYEN. Note sur la racine charnue du cerfeuil bulbeux. *Compt. Rend.* 43 (1856). 769.

PAYEN. Réaction de la Diastase sur la substance amylacée dans différentes conditions. *Ann. chim. et phys.* (4) 4 (1865). 286.

PAYEN et PERSOZ. Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions et leurs applications aux arts industriels. *Ann. de chim. et phys.* LIII. (1833). 73.

PEKELHARING. *Virchow's Festschrift* 1891, Bd. 1.

PEKELHARING. Untersuchungen über das Fibrinferment. *Verhand. d. Kon. Akad. v. Wet. Amsterdam* 1892.

PEKELHARING. Über die Beziehung des Fibrinferments des Blutserums zum Nucleoproteid des Blutplasmas. *Du Bois-Reymond's Archiv* 1895. 213 und *Centr. Physiol.* 9 (1895). 102.

PEKELHARING. Über eine neue Bereitungsweise des Pepsins. *Zeit. physiol. Chem.* 22 (1896). 233.

PEKELHARING. Über das Vorhandensein eines Nucleoproteïds in Muskeln. *Zeit. physiol. Chem.* 22 (1896). 245.

PERDRIX. Sur les fermentations produites par un microbe anaérobie (*Bacillus amylozyme*). *Ann. de l'Institut Pasteur* 5 (1891). 287.

PETERS. Untersuchungen über das Lab und die labähnlichen Fermente. *Preisschrift.* Rostock 1894.

PETIT. Variations des matières sucrées pendant la germination de l'orge. *Compt. Rend.* 120 (1895). 687.

PFEFFER. *Sitzber. d. Königl. Sächs. Ges. d. Wiss.* 1893. 1292.

PFEFFER. Über die regulatorische Bildung von Diastase. *Ber. d. math.-phys. Klasse d. Kön. Sächs. Gesell. d. Wissensch. zu Leipzig* (1896). 513.

Digitized by Google

Pfeffer. *Bied. Centr.* 1897. 26 400 aus *Ber. math.-phys. Klasse Kgl. Sächs. Gesell. Wissen. Leipzig.*

Piéri et Portier. Sur la présence d'une oxydase dans les branchies, les palpes et le sang des Acéphales. *Compt. Rend.* 123 (1896). 1314.

v. Planta. Über den Futtersaft der Bienen. *Zeit. physiol. Chem.* 12 (1888). 327.

Popoff. Über die Einwirkung von eiweifsverdauenden Fermenten auf die Nucleïnstoffe. *Zeit. f. physiol. Chem.* 18 (1894). 533.

Portes. Recherches sur les amandes amères. *Journ. de Pharm. et Chim.* 26 (1877). 410.

Pregl. Über Gewinnung, Eigenschaften und Wirkungen des Darmsaftes vom Schafe. *Pflüger's Archiv* 61 (1895). 359.

Procter. Observations on the volatile oil of *Betula lenta*. *Amer. Journ. of Pharmacy* 15 (1844). 241.

Prunet. Sur le mécanisme de la dissolution de l'amidon dans la plante. *Compt. Rend.* 115 (1892). 751.

Puriewitsch. Über die selbstthätige Entleerung der Reservestoffbehälter. *Ber. deut. bot. Gesell.* 14 (1896). p. 207.

Puriewitsch Physiologische Untersuchungen über die Entleerung der Reservestoffbehälter. *Pringsheim's Jahrb.* Vol. 31 1897. p. 1.

Quevenne. Étude microscopique et chimique du Ferment, suivie d'expéricences sur la fermentation alcoolique. *Journ. de Pharm.* (2) t. xxiv. (1838). 265.

Rachford. The influence of bile on the fat-splitting properties of pancreatic juice. *Journ. of Physiology* xii. (1891). 72.

Reinitzer. Über die wahre Natur des Gummifermentes. *Zeit. physiol. Chem.* 14 (1890). 453.

Reinitzer. Über das zellwandlösende Enzym der Gerste. *Zeit. physiol. Chem.* 23 (1897). 175.

Reiss. Über in den Samen als Reservestoff abgelagerte Cellulose und eine daraus erhaltene neue Zuckerart, die „Seminose". *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 22 (1889). 610.

Reychler. La saccharification diastasique. *Bull. Soc. chim. Paris* 3e sér. t. 1 No. 5 286, auch *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 22 (1889). 414.

Rey-Pailharde (294). Rôles respectifs du philothion et de la laccase dans les graines en germination. *Compt. Rend.* 121 (1895). 1162.

Richet. De la fermentation lactique du sucre de lait. *Compt. Rend.* 86 (1878). 550.

Richet. Du quelques conditions de la fermentation lactique. *Compt. Rend.* 88 (1879). 750.

Richet. De la diastase ureoproteique. *Compt. Rend. Soc. Biol.* S. x 1. (1894). 525.

Rideal. Some notes on papaïn digestion. *Pharm. Journ.* 3 ser. 24 (1893—4). 845.

Rideal. The conditions of papaïn digestion. *Pharm. Journ.* 3 ser. 25 (1894—5). 183.

Digitized by Google

Riess und Will. Einige Bemerkungen über „fleischfressende" Pflanzen. *Bot. Zeit.* (1875). 713.

Ringer. The influence of certain salts upon the act of clotting. *Journ. of Physiol.* xi. (1890). 369.

Ringer (238). Regarding the action of lime salts on Caseïn and on Milk. *Journal of Physiol.* xi. (1890). 464.

Ringer. Further observations on the behaviour of Caseïnogen. *Journ. of Physiol.* xii. (1891). 164.

Roberts. Note on the existence of a milk-curdling ferment in the Pancreas. *Proc. Roy. Soc.* 29 (1879). 157.

Roberts. The digestive ferments. *Lumleian Lectures* 1880.

Roberts. On the estimation of the amylolytic and proteolytic activity of pancreatic extracts. *Proc. Roy. Soc.* 32 (1881). 145.

Robiquet et Boutron. Nouvelles expériences sur les amandes amères et sur l'huile volatile qu'elles fournissent. *Ann. de chim. et phys.* 44 (1830). 352.

Robiquet und Boutron (141). Geschichtliche Darstellung der Arbeiten über die bitteren Mandeln, nebst einigen Betrachtungen über die in den Annal. der Pharmac. Bd. xxii. S. 1 enthaltene Abhandlung von Wöhler und Liebig. *Journ. der Pharm.* 23 (1837). 589 und *Liebig's Annal.* 25 (1838). 175.

Röhmann. Zur Kenntnis der diastatischen Fermente der Lymphe. *Pflüger's Archiv* 52 (1892). 157.

Röhmann. Zur Kenntnis der Glucase. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 27 (1894). 3251.

Röhmann. Zur Kenntnis der bei der Trypsinverdauung aus dem Caseïn entstehenden Produkte. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 31 (1898) 2188.

Röhmann und Lappe (138). Über die Lactase des Dünndarms. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 28 (1895). 2506.

Rolleston. Forms of animal life. 2nd. edn. 1888.

du Sablon, Leclerc (230). Sur la germination des graines oléagineuses. *Rev. gén. de Botanique* 1895. 145.

Sachs. Über das Auftreten der Stärke bei der Keimung ölhaltiger Samen. *Bot. Zeit.* 1859. 178 et seq.

Sachs. Zur Keimungsgeschichte der Dattel. *Bot. Zeit.* 1862. 241.

Sachs. Ein Beitrag zur Kenntnis der Ernährungsthätigkeit der Blätter. *Arbeit. d. Bot. Inst. in Würzburg* 3 1884. 1.

Sachs. Lectures on the Physiology of Plants. Eng. Trans. by Marshall Ward. Oxford 1887.

St Jentys. *Verhand. Akad. Wiss. Krakau* 1893.

Salkowski. Über das eiweißlösende Ferment der Fäulnisbakterien und seine Einwirkung auf Fibrin. *Zeit. Biol.* 25 (1889). 92.

Salkowski. Notiz über das diastatische Ferment der Leber. *Pflüger's Archiv* 56 (1894). 351.

Salkowski und Katsusaburo Yamaguwa (311). Zur Kenntnis des Oxydationsferments der Gewebe. *Virchow's Archiv* 147 (1897). 1.

Salter. Contributions to a fuller knowledge of starch grains. *Thesis for degree of D.Sc.* London 1898.

Digitized by Google

de Saussure. Nouvelles observations sur la composition de l'alcool et de l'éther sulphurique. *Ann. de chimie* 89 (1814). 273.

Schäfer. Experiments on the conditions of coagulation of fibrinogen. *Proc. Physiol. Soc. Journ. of Physiol.* xvii. (1895). p. xx.

Scheibler. Vorläufige Mitteilung über die Metapectinsäure aus Zuckerrüben. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* (1868). 58.

Scheibler. *Zeitschrift f. Rübenzucker Industrie* 1874. 309.

Schiff. Leçons sur la Physiologie de la digestion. Paris 1867.

Schifferer. Über die nicht krystallisierbaren Produkte der Einwirkung der Diastase auf Stärke. *Inaug.-Diss.* Kiel 1892.

Schimper. Über die Bildung und Wanderung der Kohlehydrate in den Laubblättern. *Bot. Zeit.* 1885, 738.

Schleichert. Die diastat. Fermente der Pflanzen. 1893. p. 85.

Schlesinger. Zur Kenntnis der diastatischen Wirkung des menschlichen Speichels, nebst Abrifs der Geschichte dieses Gegenstandes. *Virchow's Archiv* 125 (1891). 146 und 340.

Schloesing et Müntz. Recherches sur la nitrification par les ferments organisés. *Compt. Rend.* 84 (1877). 301; 85 (1877). 1018; 86 (1878). 892.

Schloesing et Müntz. Recherches sur la nitrification. *Compt. Rend.* 89 (1879). 891, 1074.

Schmidt. Handwörterbuch der Chemie. 1848.

Schmidt, Al.. Weiteres über den Faserstoff und die Ursachen seiner Gerinnung. *Arch. f. Anat. u. Phys.* 1862. 428, 533.

Schmidt, Al.. Neue Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung. *Pflüger's Archiv* 6 (1872). 445, 457.

Schmidt, R. H. Über Aufnahme und Verarbeitung von fetten Ölen durch Pflanzen. *Flora* 74 (1891). 304.

Schmidt-Mülheim. Beiträge zur Kenntnis des Peptons und seiner physiologischen Bedeutung. *Du Bois-Reymond's Arch. Phys.* 1880. 33.

Schmiedeburg, O.. Über Spaltungen und Synthesen im Tierkörper. *Arch. Exp. Path. Pharm.* 14 (1881). 379, Hystozyme 382.

Schneegans. Betulase, ein in *Betula lenta* enthaltenes Ferment. *Pharm. Centr.* 38, 27, 1896.

Schneegans und Gerock. Über Gaultherin, ein neues Glykosid aus *Betula lenta* L. *Arch. der Pharmacie* 1894. 437.

Schœnbein. Über Ozon und Ozonwirkungen in Pilzen. *Philosoph. Mag.* xi. No. 70, 137.

Schrötter. Beiträge zur Kenntnis der Albumosen. *Monatsch. f. Chem. Wien* 16 (1895). 609 and 17 (1896). 199.

Schützenberger. Les Fermentations. 6th edn. Bib. Sci. Int. Paris 1896.

Schützenberger. Recherches sur la constitution chimique des peptones. *Compt. Rend.* 115 (1892). 208, 764.

Schulz. *Journ. f. prakt. Chem.* 87 (1862).

Schulze und Barbieri. Zur Bestimmung der Eiweifsstoffe in den Pflanzen. *Landw. Versuchsstat.* 26 (1881). 213.


Digitized by Google

Schumberg. Über das Vorkommen des Labferments im Magen des Menschen. *Virchow's Archiv* 97 (1884). 260.

Schunck. On Rubian and its products of decomposition. *Phil. Trans.* 1851. 433.

Schunck. Erythrozyme. *Phil. Trans.* 1853. 74.

Schwann. Vorläufige Mitteilung betreffend Versuche über die Weingärung und Fäulnis. *Poggendorf's Ann.* 41 (1837). 184.

Schwann (und Müller). Versuche über die künstliche Verdauung des geronnenen Eiweifses. *Müller's Archiv* 1836. 66.

Schwann (et Müller). Experiences sur la digestion artificielle. *Ann. Sci. Nat. Zool.* (2) 7 (1837). 313.

Schweder, C. G.. Zur Kenntnis der Glutinverdauung. *Dissert.* Berlin 1867. *Virchow's Jahresbericht* 1867, Bd. 1, 152.

Schwiening. Über fermentative Prozesse in den Organen. *Virchow's Archiv* 136 (1894). 444.

Seegen. Über die Umwandlung von Glykogen durch Speichel- und Pankreassaft. *Pflüger's Archiv* 19 (1879). 106.

Seegen. On the glycolytic action of blood. *Centr. Physiol.* 5, 821, 869.

Seegen und Kratschmer. Zur Kenntnis der saccharifizierenden Fermente. *Pflüger's Archiv* 14, 593.

Seegen und Kratschmer (39). Die Natur des Leberzuckers. *Pflüger's Archiv* 22 (1880). 206.

Seyffert. Untersuchungen über Gerste und Malz-Diastase. *Zeit. f. d. ges. Brauwesen* 1898.

Sharp, Gordon. Papaïn digestion. *Pharmaceutical Journal* 3 ser. 24 (1893 bis 194). 633.

Sharp, Gordon. The action of papaïn on egg- and serum-albumin. *Pharm. Journ.* 3 ser. 24 (1893—4). 757.

Sharp, Gordon. Papaïnverdauung: Völlige Abwesenheit von Pepton. Über Papeïn. *Chem. Centr.* 1894, 1, 512.

Shore, L. E. On the effect of peptone on the clotting of blood and lymph. *Journ. of Physiol.* xi. (1890). 561.

Sigmund. Über fettspaltende Fermente im Pflanzenreiche. *Monats. f. Chem. Wien* 11 (1890). 272, auch *Sitzungsber. d. k. Akad. der Wiss. in Wien* 99 (1890). 407 und 100 (1891). 328.

Sigmund. Beziehungen zwischen fettspaltenden und glykosidspaltenden Fermenten *Sitzber. d. k. Akad. d. Wiss. in Wien* 101 (1892). 549.

Smith, F. Analysis of Saliva of horse. *Veterinary Journal* 26 June 1888.

Soxhlet. Beiträge zur physiologischen Chemie der Milch. *Journ. f. prakt. Chem.* (new ser.) 6 (1872). 1.

Soxhlet. *Milch-Zeitung* 1877. 573.

Soxhlet. Human Milk aud Cow's Milk. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 1893, übers. im *Pharm. Journ.* 3 ser. 23 (1892—3). 785.

Spazier. Über das Auftreten und die physiologiscbe Bedeutung des Myrosins in der Pflanze. *Pringsheim's Jahrb.* 25 (1893). 39.

Spitzer. Die zuckerzerstörende Kraft des Blutes und der Gewebe. *Pflüger's Archiv* 60 (1895). 303.

Digitized by Google

SPITZER. Die Bedeutung gewisser Nucleoproteïde für die oxydative Leistung der Zelle. *Pflüger's Archiv* 67 (1897). 615.

STADELMANN. Über Fermente im normalen Harne. *Zeit. f. Biol.* 24 (1888). 226.

STONE. Action of enzymes on starch of different origins. *Office of Expt. Stat. U. S. Agricultural Departement* 34 1896. 29—44.

SUNDBERG. Ein Beitrag zur Kenntnis des Pepsins. *Zeit. f. physiol. Chem.* IX. (1885). 319.

SZILAGYI. Über Diastase. *Zeit. f. g. Brauwesen* 1891. 258.

TAIT, LAWSON. Insectivorous plants. *Nature* 12 (1875). 251.

TAMMANN. Die Reaktionen der geformten Fermente. *Zeit. f. physiol. Chem.* 16 (1892). 271.

TAMMANN. Zur Wirkung ungeformter Fermente. *Zeit. f. physik. Chem.* 28 (1895). 426.

TAPPEINER. Über Celluloseverdauung. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 15 (1882). 999.

TAPPEINER. Über Cellulosegärungen. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 16 (1883) 1734.

TAPPEINER. Über die Sumpfgasgärung im Schlamme der Teiche, Sümpfe und Kloaken. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 16 (1883). 1740.

TAPPEINER. Untersuchungen über die Gärung der Cellulose insbesondere über deren Lösung im Darmkanale. *Zeit. f. Biol.* XX. (1884). 52.

TAPPEINER. Untersuchungen über die Eiweißfäulnis im Darmkanale der Pflanzenfresser. *Zeit. f. Biol.* 20 (1884). 215.

TAPPEINER. Nachträge zu den Untersuchungen über die Gärung der Cellulose. *Zeit. f. Biol.* XXIV. (1888). 105.

TEBB, Miss. On the transformation of Maltose to Glucose. *Journ. of Physiology* XV. (1894). 421.

TEBB, Miss. Hydrolysis of Glycogen. *Journ. of Physiology* XXII. (1898). 423.

THÉNARD. Sur la fermentation vineuse. *Ann. de Chimie* t. 46 (1803). 224.

THOMÉ. Über das Vorkommen des Amygdalins und des Emulsins in den bittern Mandeln. *Bot. eit. Zeit.* (1865). 240.

TIEDEMANN und GMELIN. Die Verdauung nach Versuchen. Heidelberg 1826. Bd. I. 171.

TIEGEL. Über eine Fermentwirkung des Blutes. *Pflüger's Archiv* 6 (1872). 249.

TISCHUTKIN. Die Rolle der Bakterien bei der Veränderung der Eiweißstoffe auf den Blättern von *Pinguicula*. *Ber. d. deut. bot. Gesell.* 7 (1889). 346.

TISCHUTKIN. Über die Rolle der Mikroorganismen bei der Ernährung der insektenfressenden Pflanzen. *Arbeit. d. St. Petersburg naturf. Gesell.* 1891. Ref. im *Bot. Centr.* 50 (1892). 304 und 53 (1893). 322.

TOLLENS. Über die Konstitution der Pektinstoffe. *Liebig's Annalen* 286 (1895). 292.

TOLLENS und GANZ. Über Quitten- und Salepschleim. *Liebig's Annalen* 249 (1888). 245.

TOLOMEI. *Real. Acad. Linc.* 1896. 5, 1. 52.

TRAUBE, M. (420). Zur Theorie der Gärungs- und Verwesungs-Erscheinungen, wie der Fermentwirkungen überhaupt. *Poggend. Annal.* 103 (1858). 331.

Digitized by Google

TRAUBE, M. Zur Theorie der Fermentwirkungen. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 7 (1874). 115.

TRAUBE, M. Die chemische Theorie der Fermentwirkungen und der Chemismus der Respiration. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 10 (1877). 1984.

TREUB. Sur la localisation, le transport et le rôle de l'acide cyanhydrique dans le *Pangium edule. Ann. du Jardin bot. de Buitenzorg* 13 (1895). 1.

TUBBY and MANNING. Human succus entericus. *Guy's Hospital Rep.* 48. 271.

TURPIN. Sur la cause et les effets de la fermentation alcoolique et acéteuse. *Compt. Rend.* 7 (1838). 369.

ULRICH. *Chem. Zeit.* 1895. 19, 1523.

VAN TIEGHEM. Sur la fermentation ammoniacale. *Compt. Rend.* 58 (1864) 533.

VAN TIEGHEM. Recherches physiologiques sur la germination. *Ann. des Sc. Nat.* (5) 17 (1873). 205.

VAN TIEGHEM. Inversion du sucre de canne par le pollen. *Bull. Soc. Bot. de France* 33 (1886). 216.

VIGNAL. Contribution à l'étude des bactériacées. *Thèse pour le doctorat-ès-sciences naturelles.* Paris.

VINES. On the digestive ferment of Nepenthes. *Journ. Linn. Soc. (Bot.)* 15 (1877). 427.

VINES. On the presence of a diastatic ferment in green leaves. *Annals of Botany* 1891. 409.

VINES. The proteolytic enzyme of Nepenthes. *Ann. of Bot.* 11 (1897). 563.

VUYLESTEKE. Contribution à l'étude de la diastase. *Bull. Acad. Roy. Belg.* (3) 24, 577.

WARD, Marshall. A lily disease. *Ann. of Botany* 2 (1888). 319.

WARD, Marshall. The Ginger-beer plant and the organisms composing it. *Phil. Trans. Roy Soc. B.* 1892. 125.

WARD (Marshall) and DUNLOP. On some points in the histology and physiology of the Fruits and Seeds in Rhamnus. *Ann. of Bot.* 1 (1887). 1.

WARD (Marshall) and GREEN (Reynolds). A sugar bacterium. *Proc. Roy. Soc.* Mar. 9, 1899.

WARRINGTON. On Nitrification. *Journ. Chem. Soc.* 1878, p. 44, 1879p. 429, 1884 p. 637, 1891, p. 484.

WASSERZUG. Sur la production de l'invertine chez quelques champignons. *Ann. de l'Institut Pasteur* 1 (1887). 525.

WATSON. Notes on the effect of alcohol on Saliva and on the Chemistry of digestion. *Journ. Chem. Soc. Trans.* 1879. 539.

WEHMER. Préparation d'acide citrique de synthèse par la fermentation du glucose. *Compt. Rend.* 117 (1893). 332.

WENT en PRINSEN GEERLIGS. Over suiker- en alcoholverming door organismen in verband met de verwerking der naproducten in de rietsuikerfabrieken. *Bot. Zeit.* 1895. 2e Abt. 143.

WENZ. Über das Verhalten der Eiweißstoffe bei der Darmverdauung. *Zeit. f. Biol.* 22 (1886). 1.

Digitized by Google

WEYL und BISCHOF. Über den Kleber. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 13 (1880). 367.

WIESKE, SCHULZE und FIECHSIG. Kommt der Cellulose eiweissparende Wirkung bei der Ernährung der Herbivoren zu? *Zeitschr. f. Biol.* XXII. (1886). 373.

WIESNER. Über das Gummiferment; ein neues diastatisches Ferment. *Sitzber. d. M. N. der K. Akad. der Wiss. in Wien* 92 (1885). 40, und *Ber. d. deut. chem. Gesell.* (1885). 619.

WIGAND. Das Protoplasma als Ferment-Organismus. Marburg 1888.

WIJSMAN. Diastase considered as a mixture of Maltase and Dextrinase. *Rec. Trav. Chem.* 9. 1—13.

WILLIS. De fermentatione. 1659.

WILSING. Über die Mengen der vom Wiederkäuer in den Entleerungen ausgeschiedenen flüchtigen Säuren. *Zeit. f. Biol.* XXI. (1885). 625.

WINOGRADSKY. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. de l'Inst. Pasteur* 4 (1890). 213, 257, 760; 5 (1891). 92, 577.

v. WITTICH. Über eine neue Methode zur Darstellung künstlicher Verdauungsflüssigkeiten. *Pflüger's Archiv* 2 (1869). 193.

v. WITTICH. Weitere Mitteilungen über Verdauungsfermente. *Pflüger's Arch.* 3 (1870). 339.

v. WITTICH. Weitere Mitteilungen über Verdauungsfermente des Pepsins und seine Wirkung auf Blutfibrin. *Pflüger's Archiv* 5 (1872). 435.

v. WITTICH. Über das Leberferment. *Pflüger's Archiv* 7 (1873). 28.

v. WITTICH. Zur Statik des Leberglykogens. *Centrbl. f. d. Med. Wiss.* 19 (1875). 113.

WOOD. *Laboratory Reports, Roy. Coll. Phys. Edinburgh* vol. II.

WOOLDRIDGE. On the coagulation of the blood. *Journ. of Physiology* IV. (1883). 226, 367.

WOOLDRIDGE. Blood plasma as Protoplasma. *Arris and Gade lectures. Royal College of Surgeons, June* 1886.

WOOLDRIDGE. Beiträge zur Lehre von der Gerinnung. *Du Bois-Reymond's Archiv* 1888. 174.

WORTMANN). Untersuchungen über das diastatische Ferment der Bakterien. *Zeit. physiol. Chem.* 6 (1882). 287.

WORTMANN. Über den Nachweis, das Vorkommen und die Bedeutung des diastatischen Enzyms in den Pflanzen. *Bot. Zeit.* 1890, 37, 582, 598, 617, 634, 659.

WROBLEWSKI. Zur Kenntnis des Pepsins. *Zeit. f. physiol. Chem.* 21 (1895). 1—18.

WROBLEWSKI. Über die chemische Beschaffenheit der Diastase und über das Vorkommen eines Arabans in den Diastasepräparaten. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 30 (1897. 2289.

WROBLEWSKI. Zur Klassifikation der Proteïnstoffe. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 30 (1897). 3045.

WROBLEWSKI. Über die chemische Beschaffenheit der Diastase und über die Bestimmung ihrer Wirksamkeit unter Benutzung von löslicher Stärke. *Zeit f. physiol. Chem.* 24 1898. 173.

WROBLEWSKI. Was ist die Osborn'sche Diastase. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 31 (1898). 1127.

Digitized by Google

WROBLEWSKI. Über die chemische Beschaffenheit der amylolytischen Fermente. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 31 (1898). 1130.

WÜRTZ. Sur la papaïne; contribution à l'histoire des ferments solubles. *Compt. Rend.* 90 (1880). 1379.

WÜRTZ. Nouvelle contribution à l'histoire des Ferments solubles. *Compt. Rend.* 91 (1880). 787.

WÜRTZ et BOUCHUT. Sur le ferment digestif du *Carica papaya*. *Compt. Rend.* 89 (1879). 425.

WÜRTZ et BOUCHUT. Le Papaïn. Paris 1879.

YOSHIDA. Chemistry of lacquer. *Journ. Chem. Soc.* XLIII. (1883). 472.

ZOPF. Die Pilze. Breslau 1890.

Digitized by Google

Alphabetisches Inhaltsverzeichnis.

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Autoren - Verzeichnis.

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Druck von Hermann Beyer & Söhne in Langensalza.

Digitized by Google

Verlagsbuchhandlung Paul Parey in Berlin SW., Hedemannstrafse 10.

Das chemische Laboratorium des Brauers.

Anleitung zur chemisch-technischen Betriebskontrolle.

Von Prof. Dr. **Wilhelm Windisch.**

Vierte, erweiterte Auflage.

Mit 36 Textabbildungen. Gebunden, Preis 12 M.

Anleitung zur

Untersuchung des Malzes auf Extraktgehalt

sowie auf seine Ausbeute in der Praxis

nebst Tabellen zur Ermittelung des Extraktgehaltes.

Von Prof. Dr. **Wilhelm Windisch.**

Zweite Auflage. Kartonniert, Preis 2 M 50 Pf.

Moritz und Morris.

Handbuch der Brauwissenschaft.

Auf Veranlassung der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin

ins Deutsche übertragen von

Prof. Dr. **Wilhelm Windisch.**

Mit 49 Textabbildungen. Gebunden, Preis 12 M.

Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben

mit einer Einführung in die

Hefenreinkultur, Infektionslehre und Hefenkunde.

Von Prof. Dr. **Paul Lindner**-Berlin.

Zweite, neubearbeitete Auflage.

Mit 156 Textabbildungen und 5 Lichtdrucktafeln. Gebunden, Preis 15 M.

Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie.

Von **Alfred Jörgensen.**

Vierte, neubearbeitete und vermehrte Auflage.

Mit 56 Textabbildungen. Gebunden, Preis 8 M.

Handbuch der Spiritusfabrikation.

Von Dr. **Max Maercker,**

Geheimer Regierungsrat, o. ö. Professor an der Universität, Vorsteher der agrikulturchemischen Versuchs-Station Halle a. S.

Siebente, vollständig neubearbeitete Auflage.

Mit 216 Textabbildungen. Gebunden, Preis 22 M.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung.

Digitized by Google

Verlagsbuchhandlung Paul Parey in Berlin SW., Hedemannstrafse 10.

Wochenschrift für Brauerei.

Eigentum des Vereins: Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin.
Herausgegeben von
Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. **M. Delbrück.**
XVII. Jahrgang.
Erscheint jeden Freitag. — Abonnementspreis für den Jahrgang 20 M.

Zeitschrift für Spiritusindustrie.

Offizielles Organ des Vereins der Spiritusfabrikanten in Deutschland, des Vereins der Stärke-Interessenten in Deutschland und der Brennerei-Berufsgenossenschaft.
Unter Mitwirkung von Geh. Regierungs-Rat Professor Dr. **M. Maercker** in Halle a. S.
herausgegeben von
Dr. Max Delbrück,
Geh. Regierungsrat, Professor, Vorsteher des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin.
XXIII. Jahrgang.
Erscheint jeden Mittwoch. — Abonnementspreis für den Jahrgang 20 M.

Die deutsche Essigindustrie.

Wochenschrift für das Gebiet der Alkohol-Essigfabrikation und verwandter Betriebszweige.
Eigentum des Verbandes deutscher Essigfabrikanten.
Herausgegeben vom
Institut für Gärungsgewerbe in Berlin, Abteilung für Essigfabrikation.
IV. Jahrgang.
Erscheint jeden Mittwoch. — Abonnementspreis für den Jahrgang 15 M.

Kalender für die landwirtschaftlichen Gewerbe.

Neunzehnter Jahrgang.
Herausgegeben von dem Verein der Spiritusfabrikanten in Deutschland.
1. Teil (Taschenbuch) gebunden. 2. Teil (Jahrbuch) geheftet.
Mit einer halben Seite weifs Papier pro Tag, in Leinen gebunden, Preis 3 M.
Mit einer ganzen Seite weifs Papier pro Tag, in Leder gebunden, Preis 4 M.

Handbuch der landwirtschaftlichen Gewerbe.

Von **Dr. C. J. Lintner,**
Professor an der Kgl. technischen Hochschule in München.
Mit 256 Textabbildungen und 2 Tafeln. Gebunden, Preis 12 M.

Handbuch der Presshefefabrikation.

Von **Otto Durst,**
Fabrikdirektor in Buch bei Nürnberg.
Zweite, neubearbeitete Auflage.
Mit 190 Textabbildungen und 8 Lichtdrucktafeln. Gebunden, Preis 16 M.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung.

Digitized by Google

Digitized by Google



Digitized by Google



Digitized by Google

